

522,106
10/522106

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009820 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
15/24, A01H 5/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007589

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2003 (14.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 327.0 22. Juli 2002 (22.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE];
c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOGEL, Karl-Heinz
[DE/DE]; Berggartenstr. 7, 35457 Lollar (DE). HÜCK-
ELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392
Giessen (DE). TRUJILLO, Marco [DE/DE]; Heegstrauch
Weg 10, 35394 Giessen (DE).

(74) Anwalt: PREBLER, Uwe; ., 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING THE PATHOGENIC RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining or increasing the pathogenic resistance in plants by reducing the expression, activity or the functioning of a NADPH oxidase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

WO 2004/009820 A1

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

- 10 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankungen führen zu Ernteverlusten
- 15 in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz gegen
- 20 Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
- 25 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe
- 30 wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester
- 35 (BTH; Bion®) bewirkt werden (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82). Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- 40 In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH
- 45 (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Durch klassische Züchtung erhaltene Mlo-defiziente Gerstensorten werden bereits in der Landwirtschaft

verwendet. Vermutlich aufgrund der Rezessivität hat sich trotz eines intensiven Anbaus die Resistenz als dauerhaft erwiesen. Mlo-ähnliche Resistenzen in anderen Pflanzen v.a. in Getreidearten sind nicht beschrieben. Das Mlo-Gen und verschiedene Homologe aus anderen Getreidearten wurde identifiziert und kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; 10 WO 99/47552). Nachteilig ist, dass der Mlo-vermittelte Abwehrmechanismus ein spontanes Absterben von Blattzellen umfasst (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Nachteilig ist ferner, dass die Mlo-defizienten Genotypen eine Hypersenszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* 15 (*M. grisea*) sowie *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) zeigen (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; z.B. Superoxid 20 (O_2^-), Hydroxylradikale und H_2O_2) wird eine wichtige protektive Funktion in der Reaktion auf pflanzliche Pathogene zugeordnet (Wojtaszek P (1997) Biochem J 322:681-692). Es sind verschiedene Wege bekannt, wie eine Zelle ROS zu produzieren vermag. In den Makrophagen von Säugetieren ist hier insbesondere die NADPH 25 Oxidase zu nennen, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen vermag. Homologe Enzyme wurden auch in Pflanzen identifiziert (Lamb & Dixon (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:251).

30 Es wurde gezeigt, dass Mutationen in der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase in *Arabidopsis thaliana* eine verminderte Akkumulation reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) zeigen. In Bezug auf die Hypersensitive Reaktion (HR) war das Bild uneinheitlich: Bei einer Doppelmutante wurde bei Infektion mit dem 35 avirulenten *Pseudomonas syringae* Bakterium eine verminderte HR gefunden, während mit dem virulenten Oomyceten *Peronospora parasitica* eine erhöhte HR detektiert wurde. Das Wachstum - sowohl von virulenten als auch von avirulenten *P.syringae* Stämmen - war jedoch - im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen - nicht verändert 40 (Torres MA et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:517-522). Ebenso hatte die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels des Inhibitors Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) - bei Einsatz physiologisch relevanter Konzentrationen - keinen Effekt auf die Entwicklung pathogener Pilze (Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant 45 Microbe Interact 11:292-300). Ein cDNA Fragment einer Phagozyten NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox, Homolog der großen Untereinheit

gp91phox einer Phagozyten NADPH-Oxidase) ist unter der GenBank Acc.-No.: AJ251717) beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrum von Pathogenen in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

10

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

15

a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und

20

b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

Überraschenderweise zeigt die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox) in der epidermalen Zelle durch einen sequenzspezifischen RNA-Interferenz Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger pNAox-dsRNA ("Gene-Silencing") einen signifikant reduzierten Befall infolge einer *Bgh*-Infektion (gemessen anhand der Haustorium-Ausbildung). Dieser Befund ist insbesondere deshalb überraschend, da der mit der NADPH-Oxidase in Verbindung gebrachten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative burst") im allgemeinen eine protektive Funktion zugemessen wird.

Ähnlich wie Mlo vermittelt die Verminderung der NADPH-Oxidase Expression eine breite Resistenz gegen verschiedene Isolate von *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. In transienten "Gene-Silencing"-Experimenten wird dabei die Penetrationseffizienz (Haustorien-Bildung) von *Bgh* signifikant um mehr als 35 % reduziert - ein Effekt, der in seiner Stärke dem mittels Mlo-dsRNA erreichten entspricht (Schweizer P et al. (2000) Plant J 24:895-903). In der Wildtyp Gerstensorte Pallas führen ca. 40 % der Pilzpenetrationen zu einer Haustorien-Bildung, wohingegen die Penetrationsrate bei einer Verminderung der NADPH-Oxidase Expression mittels Einbringen einer doppelsträngigen RNA der NADPH-Oxidase (pNAox-dsRNA) nur ca. 25 % beträgt. Die Tatsache, dass auch in pathogenempfindlichen Wildtyp-Sorten wie Pallas nur eine Penetration von ca. 40 bis 50 % beobachtet werden kann, ist auf die stets

- vorhandene Basalresistenz zurückzuführen. Die NADPH-Oxidase ist aufgrund der dieser Befunde als Schlüsselement für das erfolgreiche Eindringen eines Pathogens wie Bgh in die pflanzliche Zelle zu verstehen. Darüberhinaus ist das Verfahren allen
- 5 Verfahren überlegen, bei denen ein pathogen-resistenter Phänotyp durch Überexpression eines resistenzvermittelnden Proteins realisiert wird. Das Ausschalten eines Gens, lässt sich ohne Expression eines (Fremd)-Proteins realisieren. Im Idealfall wird lediglich das endogene Gen deaktiviert. Dies hat nicht zu ver-
- 10 nachlässigende Vorteile bei der Zulassung und der Akzeptanz durch den Verbraucher, der Pflanzen mit Fremdproteinen oft mit Vorbehalt begegnet. Ganz besonders vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von induzierbaren Promotoren zur Verminderung der NADPH-Oxidasemenge, Aktivität oder Funktion, was beispielsweise
- 15 bei Verwendung von pathogeninduzierbaren Promotoren eine Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglicht.

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. Bevorzugt auf solche, in denen natür-
- 20 licherweise eine NADPH-Oxidase oder ein funktionelles Äquivalent derselben exprimiert wird.

- "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches.
- 25 Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder
- 30 strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispiel-
- 35 haft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium,
- 40 Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus
- 45 ein.

Der Begriff "Pflanze" umfasst bevorzugt monokotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

5

Ferner umfasst der Begriff dikotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

10 - Brassicaceae wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

15 - Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Flachs, Roter Pfeffer, 20 Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuss- und Weinarten. Baumarten umfasst bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, 25 Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Ferner umfasst sind Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen wie beispielhaft aber nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, 30 Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, 35 Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders 40 bevorzugt monokotyle Gattungen und Arten, wie die beschriebenen Getreidearten.

Ganz besonders bevorzugt wird das Verfahren auf monokotyle Pflanzen, am meisten bevorzugt auf Pflanzen mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, 45

Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr angewendet.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von
5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel
10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten
15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine
20 erhöhte Resistenz gegen ein und mehr Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder
25 pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %
30 vermindert.

"Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren,
35 die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung
40 zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden.
45 Besonders bevorzugt sind Pilze wie beispielsweise der Mehltau. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase, ihrer Aktivität oder Funktion auch eine Resistenz

gegen weitere Pathogene bewirkt. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene:

5

Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti).

10

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

15

	Erkrankung	Pathogen
	Braunrost	Puccinia recondita
	Gelbrost	P. striiformis
20	Echter Mehltau	Erysiphe graminis / Blumeria graminis
	Spelzenbräune	Septoria nodorum
	Blattdürre	Septoria tritici
	Ährenfusariosen	Fusarium spp.
25	Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
	Flugbrand	Ustilago spp.
	Weizensteinbrand	Tilletia caries
	Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
30	Anthracnose leaf blight	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola)
	Anthracnose stalk rot	Politis; Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcata Went)
	Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
35	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
	Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
40	Black kernel rot	Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
	Borde blanco	Marasmiellus sp.
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
45	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina

	Erkrankung	Pathogen
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
5	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Coch- liobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (tele- omorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuber- culata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
10	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
15	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seed- ling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
20	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau

25	Erkrankung	Pathogen
	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
30	Green ear downy mi- ldew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
35	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
40	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)

	Erkrankung	Pathogen
5	Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, 10 Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
15	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
	Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
20	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
	Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
25	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
	Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
30	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
35	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
	Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
	Late wilt	Cephalosporium maydis

40

45

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
25	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystospora zeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochoeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
15	Rust, common corn	Puccinia sorghi
	Rust, southern corn	Puccinia polysora
	Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae
20	Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
30	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
35	Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
	Smut, common	Ustilago zeae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei snapdragon (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manhurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschiimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia*
 5 *inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an
 15 Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelötter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini*
 20 (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste,
 25 Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum*
 30 (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-
 35 Rübe), *Cercospora beticola* (*Cercospora*-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps),
 40 *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und
 45 Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f. sp. *hordei*) und Weizen (f. sp. *tritici*)), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria nodorum* und
 5 *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 3: Bakterielle Erkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
	Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
	Bacterial stalk rot	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
25	Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
	Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
	Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>corona-faciens</i>
30	Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
	Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
35	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
	Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
	Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
40	Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:

45 *Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel), *Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces*

scabies (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

3. Virale Pathogene:

10

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaic Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 4: Virale Erkrankungen

20

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)

	Krankheit	Pathogen
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
5	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
10	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
15	Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
20	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
25	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
30	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
35	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
40	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
45	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera. Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind

10 Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica barberi* ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecim-punctata* ("southern corn rootworm"), *Diabrotica virgifera* ("Western corn rootworm"), *Agrotis ipsilon* ("black cutworm"),

15 *Crymodes devastator* ("glassy cutworm"), *Feltia ducens* ("dingy cutworm"), *Agrotis gladiaria* ("claybacked cutworm"), *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus* ("wireworm"), *Aeolus mancus* ("wheat wireworm"), *Horistonotus uhlerii* ("sand wireworm"),

20 *Sphenophorus maidis* ("maize billbug"), *Sphenophorus zeae* ("timothy billbug"), *Sphenophorus parvulus* ("bluegrass billbug"), *Sphenophorus callosus* ("southern corn billbug"), *Phyllogophaga* spp. ("white grubs"), *Anuraphis maidiradicis* ("corn root aphid"), *Delia platura* ("seedcorn maggot"),

25 *Colaspis brunnea* ("grape colaspis"), *Stenolophus lecontei* ("seedcorn beetle") und *Clivinia impressifrons* ("lender seedcorn beetle").

30 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Große Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

40 Tabelle 6: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
45 Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chaltoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25

Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Hafer-

30

zystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zucker-

35

rübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

40

1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: Puccinia graminis f.sp. hordei (barley stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV),

45

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Schizaphis graminum* (greenbug); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Euschistus servus* (brown stink bug); *Deliaplatura* (seedcorn maggot); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Petrobia latens* (brown wheat mite).

2. Sojabohne:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatilis* (velvetbean caterpillar); *Plathypena scabra* (green cloverworm); *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle); *Myzus persicae* (green peach aphid); *Empoasca fabae* (potato leaf hopper); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestani* (strawberry spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

40

3. Canola:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

45

4. Alfalfa:

Pilz,, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganese* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*,
 5 *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
 10

5. Weizen:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*,
 15 *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrachum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*,
 20 *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Bromes Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomannes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust),
 25 *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)
 30

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata* (army worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western cutworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera punctata* (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum* (greenbug); *Macrosiphum avenae* (English grain aphid); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper);
 40
 45

Melanoplus differentialis (differential grasshopper);
 Melanoplus sanguinipes (migratory grasshopper); Mayetiola
 destructor (Hessian fly); Sitodiplosis mosellana (wheat
 midge); Meromyza americana (wheat stem maggot); Hylemya
 5 coarctata (wheat bulb fly); Frankliniella fusca (tobacco
 thrips); Cephus cinctus (wheat stem sawfly); Aceria tulipae
 (wheat curl mite);

6. Sonnenblume:

10

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora
 halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria
 helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alter-
 naria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macro-
 15 phomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae,
 Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi,
 Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora,
 Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo
 tragopogonis.

20

Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana (sun-
 flower bud moth); Homoeosoma electellum (sunflower moth);
 zygogramma exclamationis (sunflower beetle); Bothyrus
 gibbosus (carrot beetle); Neolasioptera murtfeldtiana
 25 (sunflower seed midge);

7. Mais:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium monili-
 30 forme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium monili-
 forme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella
 maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare, Pythium debarya-
 num, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum,
 Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis
 35 0, T (Cochliobolus heterostrophus), Helminthosporium carbonum
 I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I,
 II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis,
 Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi,
 Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macro-
 40 phomina phaseolina, Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae,
 Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inae-
 qualis, Curvularia pallescens, Clavibacter michiganese subsp.
 nebraskense, Trichoderma viride, Maize Dwarf Mosaic Virus A
 & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus,
 45 Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, Erwinia chrysanthemi
 p.v. Zea, Erwinia carotovora, Cornstunt Spiroplasma, Diplodia
 macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora

sorgi, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zaeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus,
 5 Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Spodoptera frugiperda*. (fall armyworm); *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Diatraea saccharalis* (surgarcane borer); *Diabrotica virgifera* (western corn
 15 rootworm); *Diabrotica longicornis barberi* (northern corn rootworm); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); *Melanotus* spp. (wireworms); *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer; white grub); *Cyclocephala immaculata* (southern masked chafer; white grub); *Popillia japonica*
 20 (Japanese beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Anuraphis maidiradicis* (corn root aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus sanguinipes*
 25 (migratory grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Agromyza parvicornis* (corn blot leafminer); *Anaphothrips obscurus* (grass thrips); *Solenopsis milesta* (thief ant); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

30 8. Sorghum:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*),
 40 *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*,
 45 *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

Sclerospora graminicola, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus* (sorghum borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn ear-worm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser corn-stalk borer); *Feltia subterranea* (granulate cutworm); *Phyllophaga crinita* (white grub); *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus* spp. (wireworm); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle);
10 *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Siphaflava* (yellow sugarcane aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Contarinia sorghicola* (sorghum-midge); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite);
15 *Tetranychus urticae* (two spotted spider mite).

9. Baumwolle:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); *Anthonomus grandis grandis* (boll weevil); *Aphis gossypii* (cotton aphid); *Pseudatomoscelis seriatus* (cotton fleahopper); *Trialeurodes abutilonea* (bandedwinged whitefly);
25 *Lygus lineolaris* (tarnished plant bug); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca* (tobacco thrips); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite); *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite);
30

10. Reis:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Colaspis brunnea* (grape colaspis); *Lissorhoptrus oryzophilus* (rice water weevil); *Sitophilus oryzae* (rice weevil); *Nephotettix nigropictus* (rice leaf-hopper); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug);
40

11. Raps:

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae* (cabbage aphid); *Phyllotreta cruciferae* (Flea beetle);
45 *Mamestra conjugata* (Bertha armyworm); *Plutella xylostella* (Diamond-back moth); *Delia* ssp. (Root maggots).

"NADPH-Oxidase" meint im Rahmen der Erfindung all solche Enzyme, die als wesentliche Eigenschaft befähigt sind mittels eines Einzelelektronentransfers molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. Bevorzugt sind die Enzyme die durch die EC-Klasse E.C.1.23.45.3 beschrieben werden. Dabei kann die NADPH-Oxidasen aus einem oder mehr Polypeptiden bestehen, die gleich oder unterschiedlich sein können.

Bevorzugt ist die NADPH-Oxidase ein Flavocytochromprotein und umfasst als prosthetische Gruppen ein Cytochrom b und/oder eine FAD Einheit. Die NADPH-Oxidase kann aus einem $\alpha\beta$ 1 Heterodimer bestehen, wobei die β Untereinheit die funktionelle Untereinheit des Flavocytochroms darstellen und als Glykoprotein die Elektronentransportkomponenten umfassen kann (eine hydrophile, zytosolische, C-terminale Domäne, welche NADPH und FAD enthält, sowie 4 bis 6 N-terminale, putative Transmembrane- α -Helixes, welche zwei Histidin-komplexierte prosthetische Haem-Gruppen enthält). Die α -Untereinheit kann eine C-terminale, Prolin-reiche Sequenz umfassen, welche potentielle zytosolische, aktivierende Faktoren der NADPH-Oxidase zu binden vermag. Durch die Bindung der zytosolischen phox Proteine (z.B. p47-phox, p67-phox, p40-phox) und p21rac - ein GTP-bindendes Protein - kann Aktivierung erfolgen.

Dem Fachmann sind zahlreiche NADPH-Oxidasen aus pflanzlichen Organismen bekannt (u.a. Torres MA et al. (1998) Plant J 14: 365-370). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: AJ251717 (*Hordeum vulgare*), AP003560 (*Oryza sativa* var. *japonica*), AJ320505 (*Nicotiana tabacum*), AB050660 (*Solanum tuberosum*), AF088276 (*Lycopersicon esculentum*), AB008111 (*Arabidopsis thaliana*; Atrboh F), AF055357 (*Arabidopsis thaliana*; RbohD), AJ309006 (*Nicotiana tabacum*; rboh), AP003271 (*Oryza sativa* cv. *japonica*), AF055355 (*Arabidopsis thaliana*; RbohC), AF055353 (*Arabidopsis thaliana*; RbohA). Insbesondere bevorzugt sind die NADPH-OXIDASEN, die eine Sequenz gemäß SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 umfassen.

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden. Beispielhaft seien dabei Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: CAC51517.1, AJ251717, T03973, BAB68079.1, AP003560, T02024, CAC87256.1, AJ320505, BAB70750.1, AB050660, AF088276_1, NP_564821.1, NM_105079, T00265 AC007764_16, NP_192862.1, NM_117194, AF147783_1, AAM28891.1, AF506374, CAC84140.1, AJ309006, T51804, NP_199602.1,

NM_124165, BAB89740.1, AP003271, AAC39477.1, AF055355,
 NP_199919.1, NM_124485, AAC39475.1, AF055353, NP_196356.1,
 NM_120821, NP_194239.1, NM_118641, BAB08369.1, AB015475,
 AAC39478.1, AF055356, AC069143_9, NP_173357.1, NM_101781,
 5 NP_172383.1, NM_100780, AAB70398.1, AC000106, AAC39476.1,
 AF055354, BAB70751.1, AB050661, BAB63664.1, AP003275, AAD24966.1,
 AF109150.

Besonders bevorzugt umfasst die Polypeptidsequenz der NADPH-
 10 Oxidase mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe
 von Sequenzmotiven bestehend aus

- i) AL(K/R)GL(K/R)
 - ii) DK(N/D)XDG(R/K)(I/L/V)(T/N)E
 - 15 iii) LSASAN
 - iv) IMEELDP
 - v) K(F/L)NMA(I/L)(I/V)LXPVCRN
 - vi) (E/Q)WHPFSIT
 - vii) S(A/S)PXDD(Q/Y)(L/I)S(I/V)H(V/I/L)R
 - 20 viii) DGPYG(S/A)PAGDY
 - ix) L(I/V)GLGIGATP
 - x) FYWVTREQGSF
 - xi) GVFYCG
- 25 Ganz besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2
 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten
 bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der
 Sequenzmotive i), ii), iii), iv), v), vi) vii), viii), ix) x)
 und xi). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Amino-
 30 säuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser
 Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

NADPH-Oxidase kann aber auch jede andere Einheit eines NADPH-
 Oxidase Enzymkomplexes meinen der wesentlich für Aktivität der
 35 NADPH-Oxidase ist.

"Proteinmenge" meint die Menge eines NADPH-Oxidase-Polypeptides
 in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zell-
 kompartiment. "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengen-
 40 mäßige Verminderung der Menge einer NADPH-Oxidase in einem
 Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment
 - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren -
 im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den
 dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen
 45 Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter
 der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens
 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders

bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

- 5 "Aktivität" meint die Fähigkeit einer NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. "Verminderung" der Aktivität meint die Verminderung der Gesamt-Aktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines
- 10 der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens
- 15 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

- "Funktion" meint bevorzugt die Substratbindekapazität einer
- 20 NADPH-Oxidase in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. Als Substrate kommen niedermolekulare Verbindungen wie NADPH oder FAD aber auch die Proteininteraktionspartner einer NADPH-Oxidase in Frage.

- 25 "Verminderung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Verminderung der Bindekapazität oder Bindestärke einer NADPH-Oxidase zu mindestens einem Substrat in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu
- 30 dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Unter Verminderung ist auch die Veränderung der Substratspezifität zu verstehen, wie sie beispielsweise durch den k_{cat}/K_m -Wert
- 35 ausgedrückt werden kann. Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %. Bindepartner für NADPH-Oxidase können
- 40 beispielsweise durch das Hefe-2-Hybridsystem in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

- Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge, der Aktivität von NADPH Oxidasen oder der Substratbindekapazität sind dem Fachmann
- 45 bekannt. Beispielsweise kann die NADPH abhängige, DPI-inhibierbare O_2^- oder H_2O_2 Produktion (z.B. über Nitro-Blau-Tetrazolium [NBT] oder Cytochrom c Reduktion) gemessen werden. Die Protein-

menge kann beispielsweise immunologisch unter Verwendung entsprechender Antikörper bestimmt werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Yu L et al. (1999) Blood 94(7):2497-504; Doke N (1983a) Physiol Plant Pathol 23:345-357; Levine A et al. (1994)

- 5 Cell 79:583-593; Tenhaken R et al. (1995) Proc Nat Acad Sci USA 92: 4158-4163; Sagi M & Fluhr R. (2001) Plant Physiol 126(3):1281-90; Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant Microbe Interact 11:292-300; so wie in den vorgenannten Artikeln zitierten Referenzen).

10

"Funktionelle Äquivalente" eines NADPH-Oxidase-Proteins meint bevorzugt solche Sequenzen, die von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abgeleitet oder zu dieser homolog sind und

- 15 die gleichen wesentlichen Eigenschaften aufweisen.

Dabei kann die Effizienz der Pathogenresistenz sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassen eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder

- 20 22 abweichen. Bevorzugt sind solche funktionelle Äquivalente, bei denen sich die Effizienz der Pathogenresistenz - gemessen beispielsweise an der Penetrationseffizienz eines Pathogens (Haustoriumbildung) - um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten unter Verminderung einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, bei deren Verminderung die Effizienz der Pathogenresistenz quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 übersteigt.

35

Der Vergleich wird bevorzugt unter analogen Bedingungen durchgeführt. "Analoge Bedingungen" bedeutet, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Kultur- oder Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate, Pathogenkonzentration etc.) zwischen den zu vergleichenden Versuchen identisch gehalten werden und die Ansätze sich allein durch die Sequenz der zu vergleichenden NADPH-Oxidasen, ihrem Ursprungsorganismus und gegebenenfalls dem Pathogen unterscheiden. Bei Wahl des Pathogens ist für den Vergleich jeweils das Pathogen

- 45 zu wählen, das dem jeweils anderen - unter Berücksichtigung der Artspezifität - am nächsten kommt.

- "Funktionelle Äquivalente" meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen,
- 5 welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise *Arabidopsis thaliana*) können z.B. durch
- 10 Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden. Entsprechende Sequenzen sind oben mit GenBank Acc-No. beispielhaft aufgeführt.
- 15 Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Polypeptides umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß
- 20 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 erhält.

- Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des
- 25 Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- | | | |
|----|-------------------|---------------------|
| 30 | Gap Weight: 50 | Length Weight: 3 |
| | Average Match: 10 | Average Mismatch: 0 |

- Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie
- 35 von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

- 40 Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin,
- 45 Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

5 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

10

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 durch Substitution, Insertion oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt

15 mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem Polypeptid umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 und zeichnen sich durch die gleichen wesentlichen Eigenschaften

20 wie diese aus.

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet einer eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 umfassenden NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz durch Substitution, Insertion

25 oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem der erfindungsgemäßen Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 und kodieren für Polypeptide mit den

30 gleichen wesentlichen Eigenschaften wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

Auch die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen-Bibliotheken

35 anderer Organismen, bevorzugt von den weiter unten genannten als Wirt zur Transformation geeigneten Pflanzenarten, unter Verwendung der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde, ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe

40 in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten

45 bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,

13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Funktionelle Äquivalente umfasst DNA Sequenzen, die unter
5 Standardbedingungen mit der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenzen, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder teilen der vorgenannten hybridisieren und als vollständige Sequenzen für Proteine kodieren, die die gleichen wesentlichen
10 Eigenschaften haben wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs-
15 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),
20 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und
25 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben
30 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegen-
35 wart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden
40 Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
- b) 6X SSC bei 45°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA),
45
- c) 6X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)

- d) 4XSSC, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierter Fischsperma-DNA)
- e) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- f) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschrirte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

Die Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder der NADPH-Oxidase-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

- "Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer NADPH-Oxidase, einer NADPH-Oxidase Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen. Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung einer NADPH-Oxidase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der NADPH-Oxidase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des NADPH-Oxidase-Proteins). Dabei können einer oder mehrere essentielle Einheiten der NADPH-Oxidase vermindert werden. Dabei wird die Expression eines bestimmter NADPH-Oxidase oder die NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90% vermindert.
- Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion umfasst. Beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - seien zu nennen:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 5 b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein NADPH-Oxidase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein NADPH-Oxidase-Gen-
10 transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen.
- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
15
- d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
20
- e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
25
- f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- h) Einführen von Mutationen in endogenen NADPH-Oxidase Gene
35 zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression, NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-
40 Oxidase-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des NADPH-Oxidase-Proteins, des Transports des NADPH-Oxidase-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomen-
45 anlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines NADPH-

Oxidase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz

5 beschrieben:

a) Einbringung einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA)

- 10 Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; 15 WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation 20 gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. 25 Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

- Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze 30 klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher 35 auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Samen) die Verminderung eines NADPH-Oxidase bewirken.
- 40 Das doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu 45 zumindest einem Teil einer NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz, und

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.
- 5 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu
- 10 mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein, und
- 15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

- In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.
- 20

- Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch
- 25 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der NADPH-Oxidase Zielsequenz oder einer funktionell äquivalenten Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben (bzw. zwischen
- 30 dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben).
- 35

- Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen,
- 40 bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

- Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als
- 45 Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Speicherprotein Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B.

in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-
5 RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punkt-
mutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-
Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie min-
destens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt
mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "anti-
10 sense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz
kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles
Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA
15 transkribiert von einer für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein
funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäure-
sequenz, bevorzugt von einem NADPH-Oxidase-Gen. Dabei haben die
Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen,
bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens
20 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am
meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die
vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-
25 Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer
Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribo-
nukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des
30 Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside vorliegen. Bei-
spielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen
RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stick-
stoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahin-
gehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von
35 Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modi-
fikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung
von antisense-RNA beschrieben.

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch
40 mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben
definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle
oder den Organismus eingebracht werden.

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-
45 synthetisch hergestellt werden.

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

5

Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein,

10 das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

15

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

20 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

25 dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten

30 mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann

35 die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in
40 einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert

45 und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom

einer Pflanze insertiert, um eine dauerhafte Expression der dsRNA zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, 5 die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität 10 zwischen dsRNA und einem NADPH-Oxidase Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der NADPH-Oxidase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie 15 infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der NADPH-Oxidase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die NADPH-Oxidase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenz- 20 homologie zwischen den NADPH-Oxidase Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der NADPH-Oxidase Sequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 25 oder 21 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen NADPH-Oxidase-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten mög- 30 lich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten NADPH-Oxidase-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer NADPH-Oxidase-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen ver- 35 wandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von NADPH-Oxidase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

40 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Poly- 45 adenylierungssignal) gebracht werden. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Poly-

adenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden.

- 5 Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder
- 10 enzymatisch in vitro syntetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die
- 15 Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

- Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA realisiert, transfor-
- 20 miert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.

b) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz

- Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Ver-
- 25 hinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit
- 30 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch
- 35 Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

- Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung
- 40 eines NADPH-Oxidase-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden.
- 45 Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem

Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines NADPH-Oxidase-Gens (z.B. einem NADPH-Oxidase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des NADPH-Oxidase-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppel-

strängige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann
5 ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett* 215:327-330).

- c) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz
10 kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst
15 werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die
20 Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozym-sequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"anti-
25 sense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) *Nature* 334:585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) verwendet werden, um
30 die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. NADPH-Oxidase - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321
35 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet*. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, *Methods in Cell*
40 *Biology* 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) *Plant Mol Biol*. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) *Mol Gen Genet*.
45 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden NADPH-Oxidase Proteins aufweisen

(siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

5

d) Einbringung einer NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenz zur Induktion eines Kosuppression

Die Expression einer NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz in sense-
10 Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol
15 Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise
20 representieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

25 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß
30 SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

e) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase Gene, -RNAs oder Proteine

35 Eine Verminderung einer NADPH-Oxidase Genexpression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken
40 eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen NADPH-Oxidase Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001)
45 J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem

- 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

10

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines NADPH-Oxidase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden

- 15 Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer NADPH-Oxidase cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich.
- 20 Die dazu erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann geläufig.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das NADPH-Oxidase Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr

- 25 Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

- 35 Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere
- 40 bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Genesequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer
- 45 RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol

Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

5

- f) Einbringung von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die NADPH-Oxidase Expression kann effektiv auch durch Induktion
10 des spezifischen NADPH-Oxidase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu den
15 zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H
20 (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

- g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen
25 Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.

Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter NADPH-Oxidase-Aktivität verwendet man beispielsweise
30 weise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen NADPH-Oxidase Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die
35 regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und vermindert wird.

40 Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen
45 bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird der Wirts-

organismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378)

25

h) Einführung von Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der NADPH-Oxidase-Funktion

- oder Aktivität mit dominant-negativen NADPH-Oxidase-Varianten sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz
- 5 (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAI-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. Auf-
- 10 grund der hohen Homologie zwischen den NADPH-Oxidase-Proteinen aus Mais, Reis und Gerste kann auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Protein bei Pflanzen geschlossen werden. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenzen aus Gerste, Mais oder Reis auch die Expression von
- 15 homologen NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen Arten effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden NADPH-Oxidase-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen
- 20 Varianten eines NADPH-Oxidase-Proteins aus Reis, Mais oder Gerste die Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

- Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine
- 25 Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum
- 30 Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

- "Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung, direkt oder
- 35 indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen
- 40 oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

- Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes
- 45 NADPH-Oxidase Gen). Die Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein

(z.B. Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

- 5 Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

- "Anti-NADPH-Oxidase" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression
- 10 (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer NADPH-Oxidase-dsRNA oder einer NADPH-Oxidase "antisense"-RNA - bevorzugt in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe, Organ oder Samen derselben - bedingen.
- 15 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression
- 20 in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise die NADPH-Oxidase dsRNA) dort in planta erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispiels-
- 25 weise Promotoren) bevorzugt. Die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden (wie in Beispiel 6 und 7 beschrieben). In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise
- 30 Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-NAox-Ver-
- 35 bindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense
- 40 oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor-
- 45 zugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander

verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden,
- 10 wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al.
- 15 (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten
- 20 Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben.. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und
- 25 durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

- Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen ein Promoter - zum Beispiel
- 30 durch eine homologe Rekombination - hinter ein endogenes NADPH-Oxidase-Gen platziert wird, und durch Expression einer antisense NADPH-Oxidase-RNA die erfindungsgemäße Verminderung eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirkt wird. Analog kann auch eine "anti-NADPH-Oxidase" Verbindung (zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz
- 35 kodierend für eines NADPH-Oxidase dsRNA oder eine NADPH-Oxidase antisense RNA) derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.
- 40 Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

- 5 Bevorzugt sind Vektoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen
- 10 Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al.
- 15 (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-
- 20 Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen
- 25 et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von
- 30 Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

35

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

40

- Samenspezifische Promotoren umfassen zum Beispiel den Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989)
- 45 Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519),

- des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), des Legumin B4 (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Bäumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), des Oleosin aus Arabidopsis
- 5 (WO 98/45461) und des Bce4 aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samen-
- 10 spezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2- oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens,
- 15 des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

- Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Patatin Promotor Klasse I (B33) und
- 20 den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

- Blattspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), den SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-
- 25 carboxylase) oder den ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind Epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

- 30 Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

- 35 Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

- 40 Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten
- 45 Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielhaft seien zu nennen der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein

durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334).

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

- Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gst1* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare *hsp70*- oder *hsp80*-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor. Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *Fis1*-Promotor (WO 96/34949), den *Vst1*-Promotor (Schubert et al. (1997) Plant Mol Biol 34:417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpen-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).
- Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen ferner die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden, wie beispielsweise Promotoren der Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marneau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).
- Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des *pinII* Gens (EP-A 0 375 091; Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des *wun1*- und *wun2*-Gens (US 5,428,148), des *win1*- und *win2*-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des *WIP1*-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des *MPI*-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.
- Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt die

Region -364 bis -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) Plant Mol Biol 30, 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten β -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt
5 auf. Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Abundanz durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen-induziert, sind die "acidic
10 PR-5"-(aPR5)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol 114:79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) Plant Mol Biol 16:329-331). aPR5-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um eine erhöhte
15 pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14, 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem
20 Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684;

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

25 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe
30 naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbar und epidermis-
35 spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen
40 Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren
45 enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit

- zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in
- 5 prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz den Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte und 3'-stromabwärts eine Terminator-
- 10 sequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.
- 15 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren
- 20 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.
- 25 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.
- 30 Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist
- 35 gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-
- 40 Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

- Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere
- 45 sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines bestimmten Gens gegen einen Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine Expressionskassette und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphono-

- methylylglycin) verleihen, das für das Glyphosat® degra-
dierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase),
das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon
inaktiviert), Sulfonylhurea- und Imidazolinon inaktivierende
5 Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil
degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das
eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin ver-
leih, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das
eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycin-
10 phosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen
Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphospho-
transferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin
vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine
Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht
15 (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder
Hra Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine
kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine
20 Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-
ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders
bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Gros-
kreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green
fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al.(1995) Plant Journal
25 8(5):777-784; Haseloff et al.(1997) Proc Natl Acad Sci USA
94(6):2122-2127; Reichel et al.(1996) Proc Natl Acad Sci
USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep
16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol
6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques.
30 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase
(Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992)
Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher
et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268),
die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das
35 die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in
pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der
Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder
chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In:
Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts,
40 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz be-
sonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al.,
EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-
45 gemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel
E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin
of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori

(Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- 5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in
10 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen
desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe,
Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von
Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten
enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum
15 Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnitt-
stelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst
in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden
selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem
Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse
20 und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt
zu überprüfen.

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren
oder auch Agrobacterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungs-
25 form wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmid-
vektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine
stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom
ermöglichen.

30 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer
transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die ent-
sprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirts-
zelle eingebracht wird.

35 Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion
bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von
Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology
185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch
Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten
40 Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,
zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so
dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA
kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden
Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen er-
45 folgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur
Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen
elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Ver-

- fahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaus et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

- Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

- Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch et al. (1985) Science 225: 1229f).
- Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

- Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter pflanzlicher Organismen (s.o.) und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Außerhalb der T-DNA Region können Elemente wie ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter *Agro-*

bakteria oder E.coli (z.B. nptIII) umfasst sein. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein

5 so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V;

10 An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind

15 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus

20 und Zelltyp eignen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die

25 der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz

35 gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum, Herbizid oder ein Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat WO 98/45456) verleiht(s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder

40 Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen,

45 das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von

untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Stressresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des NADPH-Oxidase-Promotors mit dem entsprechenden NADPH-Oxidase-Gen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen.

Bevorzugt sind

- a) Pilze, wie Aspergillus, Eremothecium, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Eng. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii oder Eremothecium ashbyii.

- b) Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178),
- 5 c) Pflanzen gemäß der obengenannten Definition für "Pflanzen"
- d) Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind nicht-humane Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte
- 10 tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie *Drosophila* S2 und *Spodoptera* Sf9 oder Sf21 Zellen,
- e) prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram-
- 15 negative Bakterien wie *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cyanobacter*, *Escherichia* (vor allem *Escherichia coli*), *Serratia*, *Staphylococcus*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Penicillium* oder *Klebsiella* genannt.
- 20 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des
- 25 Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife
- 30 Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. Insbesondere als Wirtsorganismen bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, auf die der erfindungsgemäße Verfahren zum Erzielen einer Pathogenresistenz gemäß oben genannten Kriterien angewendet werden kann. Ganz besonders bevorzugt sind monokotyle Pflanzen wie Weizen,
- 35 Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, als diktyledone Kulturpflanzen wie Raps, Canola, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, *Tagetes*, Salat,
- 40 *Calendula*, Melone, Kürbis oder Zucchini.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*

6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*
- 5 7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Kartoffel
(*Solanum tuberosum*)
- 10 8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Kartoffel
(*Solanum tuberosum*)
- 15 9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)
- 20 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)
- 25 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohF)
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis*
thaliana (RbohF)
- 30 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohD)
- 35 14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis*
thaliana (RbohD)
15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (rboh)
- 40 16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (rboh)
- 45 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)
18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)

19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)
20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)
21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)
22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)
23. SEQ ID NO: 23 Oligonukleotidprimer 5' NAOX
5'-GARCAAGGCTCTTTTGATTG-3'
24. SEQ ID NO: 24 Oligonukleotidprimer 3' Naox
5'-GAAATGCTCCTTATGGAATTC-3'

Abbildungen

Fig. 1: "RNA Interference" mit pNAox-dsRNA vermindert die Penetrationseffizienz des Echten Gerstenmehltau BghA6 in Gerste.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) wurde in fünf individuellen Experimenten bei Inokulation mit *Bgh* aus Gerste cv Pallas bestimmt. Die RPE errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen und der Penetrationseffizienz bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\% \text{-RPE} = 100 * (\text{RPE} - 1)$$

Die Säulen "1" bis "5" stellen die %-RPE (d.h. die Abweichung der Penetrationseffizienz vom Durchschnitt der Penetrationseffizienz der Kontrolle) bei Evaluierung von mindesten 100 Interaktionsstellen für jeweils ein unabhängiges Experiment dar. Die Säule "m" stellt die durchschnittliche %-RPE der Experimente dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

"Control-dsRNA" stellt die parallelen Experimente mit einer Kontroll-dsRNA. "pNAox"-dsRNA stellt die Experimente mit der dsRNA der NADPH-Oxidase aus Gerste dar.

- 5 Die %-RPE war in Zellen, die mit pNAox-dsRNA beschossen wurden, deutlich (Signifikanz $p=0,0054$) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA (TR: humaner Thyroid-rezeptor-dsRNA) bombardiert wurden.

10 Beispiele

Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- 25 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30 Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Sorte Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben.
- 35 (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

- Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8 cm) in Fruhstorfer Erde vom
- 40 Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16 bis 18°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis
- 45 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen

verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente

- 5 wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C, nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.
- 10 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klima-
- 15 kammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm².
- 20 Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit ca. 100 Konidien/mm² (soweit nicht anders angegeben).
- 25 Beispiel 2: Klonierung der pNAox cDNA Sequenz aus Gerste
- Die zur Isolation der HvpNAox cDNA, ihrer Klonierung, Sequenzierung und Herstellung von Sonden benötigten cDNA
- 30 Fragmente wurden mittels RT-PCR unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland oder Qiagen, Hilden, Deutschland) erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gerste-Sämlingen als Matrize verwendet. Die RNA wurde aus Pallas 3, 5 und 7 Tage nach Keimung isoliert. Darüberhinaus wurde RNA
- 35 aus Pallas und den rückgekreuzten Linien mit *mlo5*, *Mlg* oder *Mla12* 1, 2 und 5 Tage nach Inokulation mit *BghA6* am 7 Tag nach Keimung isoliert. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die von konservierten Regionen der gp91phox Homologen aus Reis und Arabidopsis thaliana abgeleitet sind (GenBank Acc.-No.: X93301 bzw.
- 40 AB008111):
- 5' NAOX: 5'-GARCAAGGCTCTTTTGATTG-3' (SEQ ID NO: 23) und
- 3' Naox: 5' GAAATGCTCCTTATGGAATTC 3' (SEQ ID NO: 24)

Für die Reaktion (25 µL-Ansatz) wurden je 1000 ng Gesamt-RNA, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 mM OPN-1 und OPN-2 Primer, 10 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Enzymmix in 1x RT-Puffer (one step RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden) eingesetzt.

5

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100™ Modell 96V; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

- | | |
|------|--|
| 1 | Zyklus mit 30 min bei 50°C |
| 10 1 | Zyklus mit 150 sec bei 94°C |
| 30 | Zyklen mit 94°C für 45 sec, 55°C für 1 min
und 72°C für 2 min |
| 1 | Zyklus mit 72°C für 7 min |

- 15 Die PCR Produkt wurde mittels 2% w/v Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein RT-PCR Produkt von 378 bp erhalten (SEQ ID NO: 1), das ein teil des offenen Leseraster der NADPH-Oxidase aus Gerste kodiert. Die entsprechende cDNA wurde aus einem Agarosegel isoliert und in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) mittels T-Überhang-Ligation kloniert. Die cDNAs wurden ausgehend von der Plasmid-DNA unter Verwendung des "Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham, Freiburg, Deutschland) sequenziert. Das Konstrukt wurde mit pGEM-T-pNAox bezeichnet.

25

Beispiel 3: In vitro Synthese der pNAox dsRNA

- Das Plasmid pGEM-T-pNAox, das für die in vitro RNA-Transkription eingesetzt wurde, beinhaltet den T7 und SP6 Promotor an den
- 30 jeweiligen Enden der insertierten Nukleinsäuresequenz, was die Synthese von sense- bzw. antisense RNA ermöglicht. Das Plasmide kann mit geeigneten Restriktionsenzymen (ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase) linearisiert werden, um eine korrekte Transkription der insertierten Nukleinsäuresequenz zu gewähr-
- 35 leisten und ein Durchlesen in vektorielle Sequenzen zu verhindern. Dazu wurden 10 µg pGEM-T-pNAox Plasmid-DNA jeweils mit ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase geschnitten. Die geschnittenen Plasmide werden in 200 µl Wasser mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in ein
- 40 neues Eppendorfreaktionsgefäß (RNase frei) transferiert und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. 180 µl der Plasmid-Lösung wurden mit 420 µl Ethanol versetzt, auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 g und - 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE Puffer aufgenommen.
- 45 Die jeweiligen Präparationen wurden direkt in eine in vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase bzw. SP6-RNA-Polymerase

eingesetzt. RNA Polymerasen wurden von Roche Molecular Biology, Mannheim, Deutschland bezogen.

Jeder Transkriptionsansatz beinhaltetete in einem Volumen of 40 µl:

- 5
- 2 µl linearisierte Plasmid DNA (1 µg)
 - 2 µl NTP's (25 mM) (1,25 mM von jedem NTP)
 - 4 µl 10xReaktionspuffer (Roche Molecular Biology),
 - 1 µl RNasin RNasin (27 Units; Roche Molecular Biology),
 - 10 2 µl RNA Polymerase (40 Units)
 - 29 µl DEPC-Wasser

- Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze aus der Transkription des "sense"- bzw. "anti-sense"-Stranges gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch Abkühlung über 30 min auf eine Endtemperatur von 37°C miteinander hybridisiert ("annealing"). Alternativ kann nach der Denaturierung das Gemisch aus sense- und antisense-Strang auch für 30 min bei -20°C gekühlt werden. Das Protein-
20 präzipitat, das sich während Denaturierung und Hybridisierung bildet wurde durch kurze Zentrifugation bei 20800 g abgetrennt und der Überstand direkt zur Beschichtung von Wolframpartikeln verwendet (s. unten). Zur Analyse wurden jeweils 1 µl jeden RNA-Stranges und der dsRNA auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel
25 aufgetrennt. Eine erfolgreiche Hybridisierung zeigte sich, durch eine Bandenverschiebung zu höherem Molekulargewicht im Vergleich zu den Einzelsträngen.

- 4 µl der dsRNA wurden Ethanol-präzipitiert (durch Zugabe von 6 µl
30 Wasser, 1 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 25 µl Ethanol, sowie Zenrifugation für mindestens 5 min bei 20000 g und 4°C) und in 500 µl Wasser resuspendiert. Das Absorbtionsspektrum zwischen 230 und 300 nm wurde gemessen, bzw. die Absorption bei 280 und 260 nm bestimmt, um die Reinheit und die Konzentration der dsRNA
35 zu bestimmen. In der Regel wurden 80 bis 100 µg dsRNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 1,80 bis 1,95 erhalten. Ein Verdau mit DNase I kann optional durchgeführt werden, beeinflusst jedoch nachfolgende Ergebnisse nicht wesentlich.

- 40 Als Kontroll-dsRNA fungierte die dsRNA des humanen Thyroïdrezeptors (Ausgangsvektor pT7betaSal (Norman C et al. (1988) Cell 55(6):989-1003) zur Verfügung gestellt von Dr. Baniahmad, Institut für Genetik, Gießen, Deutschland; die Sequenz des Insert ist beschrieben unter der GenBank Acc.-No.: NM_000461). Für die
45 Herstellung der sense-RNA wurde das Plasmid mit PvuII, für die antisense-RNA mit HindIII verdaut und die RNA dann mit T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Die einzelnen Verfahrens-

schritte zur Herstellung der Kontroll-dsRNA werden analog den oben für die pNAox-dsRNA beschriebenen durchgeführt.

Beispiel 4: Transiente Transformation, RNAi und Evaluation
5 der Pilzpathogenentwicklung

- Gerste cv Pallas Blattsegmente wurden mit einer pNAox-dsRNA zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das
- 10 Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung in eben diesen Zellen beurteilt. In allen fünf Experimenten führte die Bombardierung von Gerste cv
- 15 Pallas mit pNAox-dsRNA zu einer verminderten Anzahl von erfolgreich durch Bgh penetrierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer fremden Kontroll-dsRNA (humaner Thyroidhormonrezeptor dsRNA, TR) bombardiert wurden. Der resistenzinduzierende Effekt der pNAox-dsRNA bedingte eine durchschnittliche Verminderung der
- 20 Penetrationseffizienz durch Bgh um 35 % (Fig. 4).

- Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt das bereits für die biolistische Einführung von dsRNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer
- 25 P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1 µm (Partikeldichte 25 mg/ml) wurden mit dsRNA (Herstellung siehe oben) zusammen mit Plasmid-DNA des Vektors pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors)
- 30 als Transformationsmarker beschichtet. Dazu wurden pro Schuss die nachfolgender Mengen an dsRNA bzw. Reporterplasmid zur Beschichtung verwendet: 1 µg pGFP und 2 µg dsRNA. Dopplesträngige RNA wurde mittels Verschmelzens von "sense" und "antisense"-RNA in vitro synthetisiert (s.o.).

- 35 Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50 %igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert. Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuss 1 µg Plasmid, 2 µg dsRNA (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung
- 45 (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom

Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

- Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern
- 5 verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen
- 10 wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikel-
- 15 klumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremesen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- 20 wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-
- 25 Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer Schweizer P, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier
- 30 jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6) inokuliert und für weitere 40 bis 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.
- 35
- Blattsegmente wurden mit den beschichteten Partikeln unter Verwendung einer "particle inflow gun" bombardiert. Pro Schuss wurden 312 µg Wolframpartikel appliziert. 4 h nach der Bombardierung wurde Inokulation mit *Blumeria graminis f.sp. hordei*
- 40 Mehltau (Rasse A6) inokuliert und nach weiteren 40 h bezüglich der Infektionsanzeichen ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein reifes Haustorium und eine Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae") wurde mittels
- 45 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 100 Conidia/mm² ergibt eine Angriffsfrequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine

minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

5

1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
- 10 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
- 15 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,1 % Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In pNAox-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein

25 Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei transformierten

30 Zellen (Transformation mit pNAox- oder Kontroll-dsRNA) und der Penetrationseffizienz bei untransformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\% \text{-RPE} = 100 * (\text{RPE} - 1)$$

40

Der %-RPE-Wert (Abweichung von der durchschnittlichen Penetrationseffizienz der Kontrolle) dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pNAox-dsRNA transfiziert sind (Fig. 4).

45

Bei der Kontroll-dsRNA wurde bei fünf unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen der Transfektion mit der Kontroll dsRNA und Wasser bezüglich der Penetrationseffizienz von *Bgh* beobachtet.

- 5 Um einen Einfluss auf der dsRNA auf die Transformationsrate oder Überlebensrate der angegriffenen Zellen auszuschließen, wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen Kontroll- und *pNAox*-dsRNA Experimenten verglichen. Die *pNAox*-dsRNA hatten keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl- oder die Anzahl der ange-
- 10 griffenen GFP-exprimierenden Zellen.

Beispiel 5: Inhibition der NADPH-Oxidase mit Diphenyleniodoniumchlorid

- 15 Untermuert werden die Ergebnisse durch weitere Experimente mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI; Tabelle 1). Im allgemeinen wurden die Experimente durchgeführt wie von Hückelhoven und Kogel, 1998.

- 20 Tab. 1: Wirkung von DPI auf die Pathogenabwehr in *Pallas*^a

Art der Interaktion	Interaktionen (% \pm Standardfehler)	
	Kontrolle ^b	200 μ M DPI ^c
25 Penetration	68.25 \pm 9.9	16.25 \pm 0.5
Nicht-Penetration	24.25 \pm 6.3	67.5 \pm 9.5
HR (Hypersensitive	7.5 \pm 3.7	16.25 \pm 9.3
Reaktion)		

- 30 a DPI-Behandlung erfolgte 12 h nach Pathogen-Inokkulation, die Auswertung 36 h nach Inokkulation.
- b Kontrolle mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, mit DMSO
- 35 Gehalt wie bei DPI Behandlung.
- c DPI gelöst in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, ausgehend von einer 10 mg/ml DPI Stammlösung in DMSO.

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,
5 dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion
einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe,
Organ, Teil oder Zelle derselben und
10
- b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder
Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen
mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die NADPH-Oxidase kodiert
wird durch
- a) Polypeptidsequenzen umfassend eine Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22,
20 oder
- b) Polypeptidsequenzen eines funktionellen Äquivalentes
eines Polypeptides, welches eine Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
25 umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das funktionelle Äquivalent
eine Homologie von mindestens 50 % zu einem der Polypeptide
gemäss SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
30 hat.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Ver-
minderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer
NADPH-Oxidase gewährleistet wird durch Anwendung eines Ver-
fahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
35
- a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase Ribo-
nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewähr-
leistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten,
40
- b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäure-
sequenz oder einer deren Expression gewährleistenden
Expressionskassette,

- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 5 d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 10 e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 15 f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- g) Einbringen von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen und
- 20 h) Einführung von Mutationen in ein endogenes NADPH-Oxidase Gen.
- 5.. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend
- 25 (i) die stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für
- 30 a) eine doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Ribonukleinsäuresequenz oder
- b) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder
- 35 c) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder
- d) eine NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur
- 40 Induktion einer Kosuppression oder
- e) DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine
- f) den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale
- 45 Nukleinsäuresequenzen

- (ii) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
- (iii) Expression besagter Nukleinsäuresequenz in einer Menge
und für eine Zeit hinreichend, um eine Pathogenresistenz
in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Patho-
gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Pil-
zen, Insekten, Viren und Nematoden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Patho-
gen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus
Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten,
Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze
aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt
ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze
ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen
bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais,
Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder
Zuckerrohr.
10. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression
einer NADPH-Oxidase umfassend
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribo-
nukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu
mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer
Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang
unter a) im wesentlichen komplementären ist.
11. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 10, wobei die bei-
den RNA-Stränge der doppelsträngigen RNA kovalent miteinander
verbunden sind.
12. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 10 oder
11, wobei einer der beiden RNA-Stränge kodiert wird durch
zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für
eine NADPH-Oxidase Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent
derselben.

13. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Transgene Expressionskassette enthaltend zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in antisense-Orientierung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor funktionell verknüpft ist.
15. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei der in Pflanzen funktionelle Promotor ein pathogen-induzierbarer Promotor ist.
16. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15.
17. Transgener Organismus enthaltend ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Transgener Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen.
19. Transgener Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohllarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
20. Gewebe, Organ, Teil, Zelle, Zellkultur oder Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 18 oder 19.

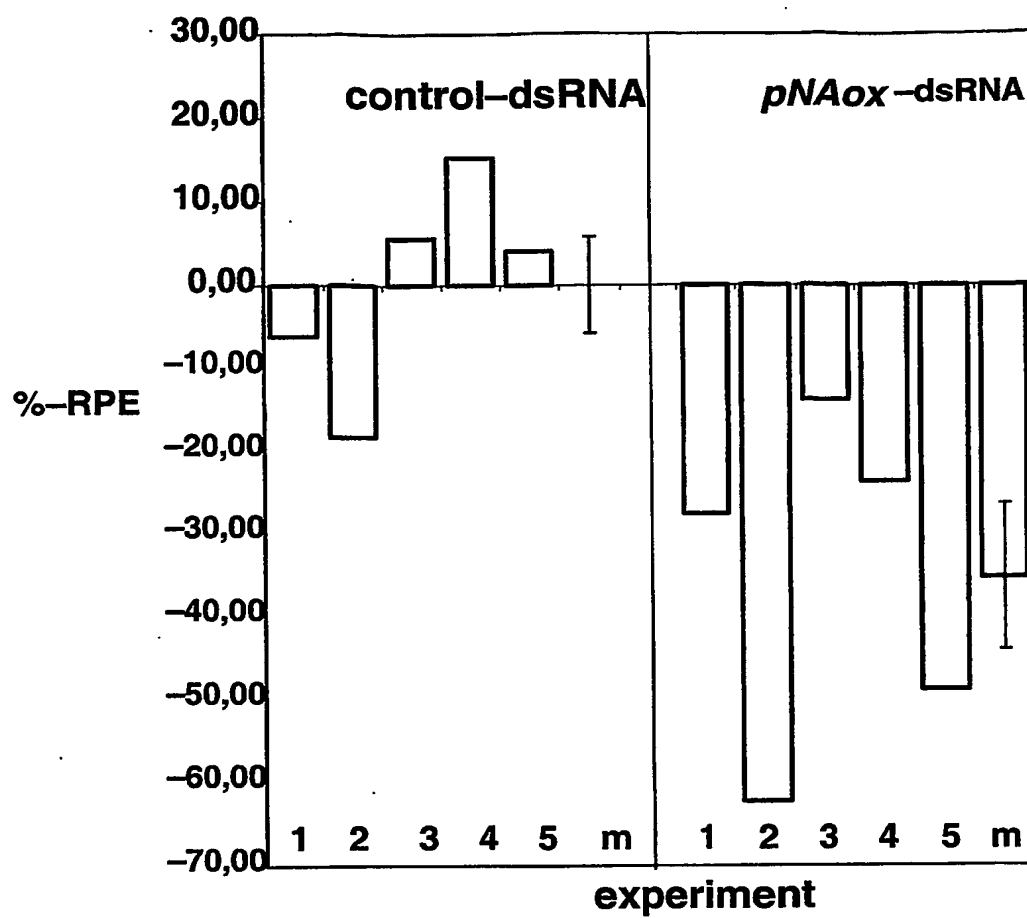


Fig. 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

<130> AE20020416

<140>

<141>

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 337

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(337)

<223> coding for NADPH-oxidase (fragment)

<400> 1.

```

g ttt aaa gga atc atg aat gag att gct gaa cta gat caa agg aat atc 49
Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ile Ala Glu Leu Asp Gln Arg Asn Ile
      1             5             10             15

att gag atg cac aac tat ctc aca agt gtt tat gag gaa ggg gat gct 97
Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala
      20             25             30

cgg tca gca ctc atc aca atg ctg caa gct ctc aac cat gcc aag aat 145
Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn
      35             40             45

ggt gtc gat gta gtg tct ggm act cga gtc cgg aca cat ttt gca aga 193
Gly Val Asp Val Val Ser Xaa Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg
      50             55             60

cca aat ttt aag agg gtg ctg tct aag gta gcc gcc aaa cat cct tat 241
Pro Asn Phe Lys Arg Val Leu Ser Lys Val Ala Ala Lys His Pro Tyr
      65             70             75             80

gcc aag ata gga gtg ttc tat tgc gga gct cca gtt ctg gcg cag gaa 289
Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu
      85             90             95

cta agc aac ctt tgc cat gag ttc aat ggc aaa tgc acg aca aaa ttc 337
Leu Ser Asn Leu Cys His Glu Phe Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe
      100            105            110

```

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

```

Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ile Ala Glu Leu Asp Gln Arg Asn Ile
      1             5             10             15

Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala
      20             25             30

Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn
      35             40             45

```

Gly	Val	Asp	Val	Val	Ser	Xaa	Thr	Arg	Val	Arg	Thr	His	Phe	Ala	Arg
50						55					60				
Pro	Asn	Phe	Lys	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Ala	Ala	Lys	His	Pro	Tyr
65					70					75					80
Ala	Lys	Ile	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Ala	Gln	Glu
				85					90					95	
Leu	Ser	Asn	Leu	Cys	His	Glu	Phe	Asn	Gly	Lys	Cys	Thr	Thr	Lys	Phe
			100					105					110		

<210> 3

<211> 2832

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2829)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 3

atg	agg	ggc	ggc	gcc	tcc	tcg	gga	ccc	cag	cga	tgg	ggc	tcg	gcg	ggg	48
Met	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Pro	Gln	Arg	Trp	Gly	Ser	Ala	Gly	
1				5					10					15		
acg	aca	ccg	cgg	tcg	ctg	agc	acg	ggc	tcg	tcg	ccg	cgc	ggg	tcc	gac	96
Thr	Thr	Pro	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	
			20					25					30			
gac	cgg	agc	tcc	gac	gac	ggg	gag	gag	ctg	gtc	gag	gtc	acg	ctc	gac	144
Asp	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Thr	Leu	Asp	
			35				40					45				
ctg	cag	gac	gac	gac	acc	att	gtg	ctt	cgg	agc	gtc	gag	ccc	gcg	gcg	192
Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Ala	
	50					55					60					
gcg	gcg	gcg	gcg	ggg	gtg	ggg	gcg	ggg	gcg	ggg	gcg	gcg	tcg	gcg	cgg	240
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	
65					70				75						80	
ggg	gag	ctc	acg	ggt	ggc	ccg	tcg	tcg	tcg	tcg	tcg	cgg	tcg	agg	tcg	288
Gly	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	
				85				90						95		
ccg	tcg	atc	cgg	agg	agc	tcg	tcg	cac	cgg	ctg	ctg	cag	ttc	tcg	cag	336
Pro	Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Gln	Phe	Ser	Gln	
			100					105					110			
gag	ctc	aag	gcg	gag	gcc	atg	gcc	cgg	gcg	cgg	cag	ttc	tcg	cag	gac	384
Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	
			115				120					125				
ctg	acc	aag	cgg	ttc	ggc	cgc	agc	cac	agc	cgc	agc	gaa	gcg	cag	gcg	432
Leu	Thr	Lys	Arg	Phe	Gly	Arg	Ser	His	Ser	Arg	Ser	Glu	Ala	Gln	Ala	
	130					135					140					
ccg	tcg	ggc	ctc	gag	tcc	gcg	ctc	gcc	gcc	cgc	gcc	gcg	cgg	cgg	cag	480
Pro	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	
145					150				155						160	
cgc	gcg	cag	ctc	gac	cgc	aca	cgc	tcc	ggc	gcc	cac	aag	gcg	ctc	cgc	528
Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Gly	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Arg	
				165					170					175		

ggc ctc cgc ttc atc agc agc aac aag gcc aac aac gcc tgg atg gag	576
Gly Leu Arg Phe Ile Ser Ser Asn Lys Ala Asn Asn Ala Trp Met Glu	
180 185 190	
gtg cag gcc aac ttc gac cgc ctc gcc cgc gac ggc tac ctc tcc cgc	624
Val Gln Ala Asn Phe Asp Arg Leu Ala Arg Asp Gly Tyr Leu Ser Arg	
195 200 205	
tcc gac ttc gcc gaa tgc atc ggg atg acg gaa tcg aag gag ttc gcg	672
Ser Asp Phe Ala Glu Cys Ile Gly Met Thr Glu Ser Lys Glu Phe Ala	
210 215 220	
ctc gag ctg ttc gac acg ctg agc cgg cga cga cag atg aag gtg gac	720
Leu Glu Leu Phe Asp Thr Leu Ser Arg Arg Arg Gln Met Lys Val Asp	
225 230 235 240	
acg att aac aag gat gaa ctc cgc gag atc tgg cag cag atc acc gat	768
Thr Ile Asn Lys Asp Glu Leu Arg Glu Ile Trp Gln Gln Ile Thr Asp	
245 250 255	
aac agc ttc gac tcc cgt ctc caa atc ttc ttc gaa atg gtg gat aag	816
Asn Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Glu Met Val Asp Lys	
260 265 270	
aac gcg gac ggc cgg att acg gag gcg gag gtg aaa gag att att atg	864
Asn Ala Asp Gly Arg Ile Thr Glu Ala Glu Val Lys Glu Ile Ile Met	
275 280 285	
ttg agc gcg tct gcc aat aaa ctg tcg agg ctt aag gag caa gca gaa	912
Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu	
290 295 300	
gag tac gcc gct ttg atc atg gag gag ctt gat cct gaa ggg ctc ggc	960
Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Gly Leu Gly	
305 310 315 320	
tac att gag cta tgg caa ttg gag aca ctt ctg ttg cag aaa gat acc	1008
Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr	
325 330 335	
tat atg aac tat agt cag gcc ctt agt tac aca agc caa gca ctg agc	1056
Tyr Met Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser	
340 345 350	
cag aat ctt gca ggg cta agg aag aag agt tca atc cgc aaa ata agc	1104
Gln Asn Leu Ala Gly Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ile Arg Lys Ile Ser	
355 360 365	
acc tct tta agc tac tat ttc gag gac aac tgg aaa cgt tta tgg gtg	1152
Thr Ser Leu Ser Tyr Tyr Phe Glu Asp Asn Trp Lys Arg Leu Trp Val	
370 375 380	
ctt gca ttg tgg att ggg ata atg gct gga ctg ttc acc tgg aaa ttc	1200
Leu Ala Leu Trp Ile Gly Ile Met Ala Gly Leu Phe Thr Trp Lys Phe	
385 390 395 400	
atg cag tat cgt aac cga tat gtc ttt gat gtg atg ggc tac tgt gtc	1248
Met Gln Tyr Arg Asn Arg Tyr Val Phe Asp Val Met Gly Tyr Cys Val	
405 410 415	
aca aca gca aaa gga gct gct gaa acc cta aag ctg aat atg gca att	1296
Thr Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Ile	
420 425 430	
atc ctc ctg cca gta tgc cgt aac acc att act tgg ttg cga agt aca	1344
Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr	
435 440 445	

agg gct gca cgg gca cta cct ttt gat gac aac atc aac ttc cac aag	1392
Arg Ala Arg Ala Leu Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys	
450 455 460	
act att gca gca gca att gtg gtt ggt ata atc ctc cat gca ggg aac	1440
Thr Ile Ala Ala Ala Ile Val Val Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn	
465 470 475 480	
cac ctt gta tgc gat ttt cca cgg tta ata aaa tca tca gat gag aag	1488
His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Lys Ser Ser Asp Glu Lys	
485 490 495	
tat gct cct ttg ggc cag tat ttt ggg gaa ata aag cca aca tat ttt	1536
Tyr Ala Pro Leu Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Ile Lys Pro Thr Tyr Phe	
500 505 510	
aca ttg gtc aaa gga gtg gag ggc atc act ggg gta atc atg gtt gta	1584
Thr Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Ile Met Val Val	
515 520 525	
tgc atg ata att gct ttt act cta gca acc cgg tgg ttc cgc cgt agc	1632
Cys Met Ile Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser	
530 535 540	
ttg gtt aag ctt cca agg cca ttt gac aaa ctg act ggc ttc aat gcc	1680
Leu Val Lys Leu Pro Arg Pro Phe Asp Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala	
545 550 555 560	
ttt tgg tat tct cat cat ctg ttc atc att gtg tat atc gcg ctc att	1728
Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ile Ala Leu Ile	
565 570 575	
gtt cat gga gag tgt cta tac ctt att cat gtc tgg tac aga aga acg	1776
Val His Gly Glu Cys Leu Tyr Leu Ile His Val Trp Tyr Arg Arg Thr	
580 585 590	
aca tgg atg tat ctt tca gtg cct gtt tgc ttg tat gta ggg gag agg	1824
Thr Trp Met Tyr Leu Ser Val Pro Val Cys Leu Tyr Val Gly Glu Arg	
595 600 605	
att cta agg ttc ttc agg tct ggc agt tat tct gtc cgg cta ttg aag	1872
Ile Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys	
610 615 620	
gtg gcc ata tat cca ggt aat gtt ttg aca ctg caa atg tcc aag cct	1920
Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro	
625 630 635 640	
ccc acg ttc cgt tac aag agt gga caa tat atg ttt gtt caa tgt cca	1968
Pro Thr Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro	
645 650 655	
gca gtg tct ccc ttt gaa tgg cat ccc ttc tca att act tca gca cct	2016
Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro	
660 665 670	
ggg gat gac tac ctc agc att cat gtt cga caa ctt ggt gat tgg aca	2064
Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Val Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr	
675 680 685	
cga gaa ctc aag aga gta ttt gct gca gct tgt gag ccc cca gcg ggt	2112
Arg Glu Leu Lys Arg Val Phe Ala Ala Ala Cys Glu Pro Pro Ala Gly	
690 695 700	
ggg aaa agc ggc ctt ctt agg gca gat gag aca act aag aaa atc tta	2160
Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ile Leu	
705 710 715 720	

ccc aag ctt ctg att gat gga ccg tat ggt tct cct gct cag gat tac 2208
 Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ser Pro Ala Gln Asp Tyr
 725 730 735

agc aag tat gat gtt tta tta ctt gtt gga tta gga att ggt gcg aca 2256
 Ser Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 740 745 750

ccc ttt att agc ata tta aaa gat ctt ctg aat aac atc atc aaa atg 2304
 Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Ile Lys Met
 755 760 765

gag gaa gag gag gat gct tct act gat ctt tat cca cca atg ggt cgg 2352
 Glu Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Asp Leu Tyr Pro Pro Met Gly Arg
 770 775 780

aat aag cca cat gtt gat ctg ggc aca ctt atg acg att acc tca aga 2400
 Asn Lys Pro His Val Asp Leu Gly Thr Leu Met Thr Ile Thr Ser Arg
 785 790 795 800

cca aag aag atc ttg aag acc aca aat gct tac ttt tac tgg gtg aca 2448
 Pro Lys Lys Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr
 805 810 815

cgt gag caa ggc tct ttt gat tgg ttc aaa gga gtc atg aat gaa att 2496
 Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Ile
 820 825 830

gct gac ttg gat caa agg aat atc att gag atg cac aac tac cta aca 2544
 Ala Asp Leu Asp Gln Arg Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr
 835 840 845

agc gtc tat gag gag ggg gat gcc agg tca gca ctc atc acc atg ctc 2592
 Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu
 850 855 860

caa gct ctg aac cat gcc aag aat gga gtt gat att gtc tct ggg aca 2640
 Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr
 865 870 875 880

aaa gtc cgg aca cat ttt gca cga cca aat tgg aga aag gtc ctt tct 2688
 Lys Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Leu Ser
 885 890 895

aaa att tcc tcc aag cat cca tat gcc aaa ata ggt gta ttc tac tgt 2736
 Lys Ile Ser Ser Lys His Pro Tyr Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys
 900 905 910

gga gct cca gtc ctg gca caa gaa cta agc aaa ctt tgc cat gaa ttc 2784
 Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu Leu Ser Lys Leu Cys His Glu Phe
 915 920 925

aac ggg aaa tgc aca acg aag ttc gaa ttc cat aag gag cat ttc tga 2832
 Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
 930 935 940

<210> 4
 <211> 943
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 4
 Met Arg Gly Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Arg Trp Gly Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Pro Arg Ser Leu Ser Thr Gly Ser Ser Pro Arg Gly Ser Asp
 20 25 30

Asp	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Thr	Leu	Asp
		35					40					45			
Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Ala
	50					55					60				
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg
	65				70					75					80
Gly	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser
				85					90					95	
Pro	Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Gln	Phe	Ser	Gln
			100					105					110		
Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp
		115					120					125			
Leu	Thr	Lys	Arg	Phe	Gly	Arg	Ser	His	Ser	Arg	Ser	Glu	Ala	Gln	Ala
	130					135					140				
Pro	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln
145					150					155					160
Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Gly	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Arg
				165					170					175	
Gly	Leu	Arg	Phe	Ile	Ser	Ser	Asn	Lys	Ala	Asn	Asn	Ala	Trp	Met	Glu
			180					185					190		
Val	Gln	Ala	Asn	Phe	Asp	Arg	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Tyr	Leu	Ser	Arg
		195					200					205			
Ser	Asp	Phe	Ala	Glu	Cys	Ile	Gly	Met	Thr	Glu	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala
	210					215					220				
Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Thr	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Gln	Met	Lys	Val	Asp
225					230					235					240
Thr	Ile	Asn	Lys	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu	Ile	Trp	Gln	Gln	Ile	Thr	Asp
				245					250					255	
Asn	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Phe	Phe	Glu	Met	Val	Asp	Lys
			260					265					270		
Asn	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Lys	Glu	Ile	Ile	Met
		275					280					285			
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Gln	Ala	Glu
						295					300				
Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Glu	Gly	Leu	Gly
305					310					315					320
Tyr	Ile	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Thr
				325					330					335	
Tyr	Met	Asn	Tyr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser
			340					345					350		
Gln	Asn	Leu	Ala	Gly	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Ser	Ile	Arg	Lys	Ile	Ser
		355					360					365			
Thr	Ser	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Asp	Asn	Trp	Lys	Arg	Leu	Trp	Val
						375					380				
Leu	Ala	Leu													

Thr Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Ile
 420 425 430
 Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr
 435 440 445
 Arg Ala Ala Arg Ala Leu Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys
 450 455 460
 Thr Ile Ala Ala Ala Ile Val Val Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn
 465 470 475 480
 His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Lys Ser Ser Asp Glu Lys
 485 490 495
 Tyr Ala Pro Leu Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Ile Lys Pro Thr Tyr Phe
 500 505 510
 Thr Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Ile Met Val Val
 515 520 525
 Cys Met Ile Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser
 530 535 540
 Leu Val Lys Leu Pro Arg Pro Phe Asp Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala
 545 550 555 560
 Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ile Ala Leu Ile
 565 570 575
 Val His Gly Glu Cys Leu Tyr Leu Ile His Val Trp Tyr Arg Arg Thr
 580 585 590
 Thr Trp Met Tyr Leu Ser Val Pro Val Cys Leu Tyr Val Gly Glu Arg
 595 600 605
 Ile Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys
 610 615 620
 Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro
 625 630 635 640
 Pro Thr Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro
 645 650 655
 Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro
 660 665 670
 Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Val Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr
 675 680 685
 Arg Glu Leu Lys Arg Val Phe Ala Ala Ala Cys Glu Pro Pro Ala Gly
 690 695 700
 Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ile Leu
 705 710 715 720
 Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ser Pro Ala Gln Asp Tyr
 725 730 735
 Ser Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 740 745 750
 Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Ile Lys Met
 755 760 765
 Glu Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Asp Leu Tyr Pro Pro Met Gly Arg
 770 775 780
 Asn Lys Pro His Val Asp Leu Gly Thr Leu Met Thr Ile Thr Ser Arg
 785 790 795 800

Pro Lys Lys Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr
805 810 815
Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Ile
820 825 830
Ala Asp Leu Asp Gln Arg Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr
835 840 845
Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu
850 855 860
Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr
865 870 875 880
Lys Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Leu Ser
885 890 895
Lys Ile Ser Ser Lys His Pro Tyr Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys
900 905 910
Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu Leu Ser Lys Leu Cys His Glu Phe
915 920 925
Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
930 935 940

<210> 5

<211> 2889

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2886)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 5

atg agg ggt tta cct ggg cat gaa cgc cgg tgg aca tcc gat acg gta	48
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val	
1 5 10 15	
tct tcc gac aag gat ttt agt ggt gaa tta tcg ccg gga gct gat tcc	96
Ser Ser Asp Lys Asp Phe Ser Gly Glu Leu Ser Pro Gly Ala Asp Ser	
20 25 30	
ggc tat aat tcc ggt ttt gct tcc gag gag ttt gtt gaa gtc acg ctt	144
Gly Tyr Asn Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Thr Leu	
35 40 45	
gat ctt cag gat gat gat acc att att cta cgg agc gtt gaa ccg gct	192
Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala	
50 55 60	
act gtg att aac att gac gct cct gat ctt ccc gcc gga gtc ggt att	240
Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala Pro Asp Leu Pro Ala Gly Val Gly Ile	
65 70 75 80	
tcc gga gtt tca att gaa act ccg acg tca gca tcg gtg tcg gaa tct	288
Ser Gly Val Ser Ile Glu Thr Pro Thr Ser Ala Ser Val Ser Glu Ser	
85 90 95	
cga tcg ccg acg atc cgc cgg agt tca tct agt aaa ctt cgt cag ttt	336
Arg Ser Pro Thr Ile Arg Arg Ser Ser Ser Ser Lys Leu Arg Gln Phe	
100 105 110	

tca	cag	gag	ttg	aaa	gct	gag	gcg	gtt	gcg	aaa	gcg	agg	cag	ttt	tca	384
Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Arg	Gln	Phe	Ser	
		115					120					125				
caa	gag	ctg	aag	gcg	gag	tta	agg	aga	ttc	tca	tgg	agc	cat	ggg	cat	432
Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	His	Gly	His	
		130				135					140					
gcg	tct	cgc	gcg	ttt	tcg	ccc	tcg	tcg	ttt	ttt	caa	aac	gcc	gtc	gtt	480
Ala	Ser	Arg	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Ala	Val	Val	
		145			150					155					160	
gga	aca	ggg	aac	ggc	gtg	gac	tcg	gct	tta	gcg	gca	cgt	gca	tta	cgt	528
Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Val	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Arg	
			165						170					175		
cgg	caa	cgc	gcg	cag	ctt	gat	cgg	act	cgt	tcc	agc	gcc	cat	aga	gct	576
Arg	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	His	Arg	Ala	
			180					185					190			
ctt	cgt	aga	ctc	aaa	ttc	att	agc	aat	aac	aaa	acc	aat	gga	tgg	aat	624
Leu	Arg	Arg	Leu	Lys	Phe	Ile	Ser	Asn	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly	Trp	Asn	
		195					200					205				
gaa	gtt	gaa	aac	aat	ttc	tca	aag	ctc	gct	aaa	gac	ggg	tat	ctt	tac	672
Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Phe	Ser	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	
		210				215					220					
cgt	tcc	gat	ttc	gca	caa	tgc	ata	ggg	atg	aag	gat	tcg	aag	gaa	ttt	720
Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	
		225			230					235					240	
gca	ttg	gaa	tta	ttt	gat	gct	ttg	agt	aga	aga	aga	aga	tta	aag	gtt	768
Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	Lys	Val	
				245					250					255		
gat	aaa	att	agc	aag	gag	gaa	ttg	tat	gag	tac	tgg	tct	caa	atc	acc	816
Asp	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Ser	Gln	Ile	Thr	
			260					265					270			
gat	cag	agt	ttc	gat	tct	cgg	ctt	cag	atc	tcc	ttc	gac	atg	gtg	gac	864
Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Ser	Phe	Asp	Met	Val	Asp	
		275					280					285				
aag	aat	gaa	gat	ggg	cga	att	gct	gaa	gag	gaa	gta	aaa	gag	atc	atc	912
Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Arg	Ile	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Ile	Ile	
		290				295					300					
atg	cta	agt	gca	tct	gca	aac	aag	tta	tca	aga	tta	aaa	gaa	caa	gca	960
Met	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Gln	Ala	
		305			310					315					320	
gag	gag	tat	gca	gct	tta	atc	atg	gaa	gaa	tta	gat	cct	gaa	aga	ctc	1008
Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Glu	Arg	Leu	
				325					330					335		
ggc	tac	att	gag	cta	tgg	cag	ctg	gaa	aca	ctt	ctc	ctc	caa	aag	gac	1056
Gly	Tyr	Ile	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	
			340					345					350			
act	tac	ctc	aac	tac	agt	caa	gca	cta	agt	tac	acg	agc	caa	gcc	ttg	1104
Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ala	Leu	
		355					360					365				
agc	caa	aac	ctt	cac	gga	tta	agg	aag	aaa	agc	cca	ata	aaa	aga	atg	1152
Ser	Gln	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Pro	Ile	Lys	Arg	Met	
		370				375					380					

agc	aca	aaa	ctt	gtc	tat	tca	ttg	caa	gaa	aac	tgg	aag	aga	att	tgg	1200
Ser	Thr	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	
385					390					395					400	
ggt	ctc	act	tta	tgg	att	ttg	ata	atg	att	ggg	ctt	ttt	ctt	tgg	aag	1248
Val	Leu	Thr	Leu	Trp	Ile	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Lys	
				405					410					415		
ttc	tat	cag	tac	aaa	aac	aag	agt	gca	ttc	cgt	gtc	atg	ggg	tat	tgc	1296
Phe	Tyr	Gln	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ser	Ala	Phe	Arg	Val	Met	Gly	Tyr	Cys	
			420					425					430			
ctt	gtc	acg	gct	aag	ggc	gct	gct	gag	act	ctc	aag	ttc	aac	atg	gct	1344
Leu	Val	Thr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Phe	Asn	Met	Ala	
			435					440					445			
ctt	ata	tta	ttg	cca	gta	tgc	aga	aac	act	att	aca	tgg	ctc	agg	tcc	1392
Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Ser	
	450					455					460					
acc	aag	ttg	agc	cat	ttt	gta	ccc	ttt	gac	gac	aac	atc	aac	ttt	cac	1440
Thr	Lys	Leu	Ser	His	Phe	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	Phe	His	
465					470					475					480	
aag	act	gtc	gct	gca	gcc	att	gtc	act	ggg	atc	ata	ctc	cat	gct	ggg	1488
Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Leu	His	Ala	Gly	
				485					490					495		
aac	cat	ctt	gta	tgt	gat	ttc	cca	agg	ctt	ata	cat	gca	gat	gat	caa	1536
Asn	His	Leu	Val	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Ile	His	Ala	Asp	Asp	Gln	
			500					505					510			
gat	tat	caa	agt	ttt	ttg	tcg	aat	gat	ttt	ggc	caa	agt	aag	cct	gga	1584
Asp	Tyr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Phe	Gly	Gln	Ser	Lys	Pro	Gly	
		515					520						525			
tac	ata	gac	ctt	gtt	aaa	gga	gtt	gag	ggg	gtg	acg	gga	ata	ata	atg	1632
Tyr	Ile	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Met	
	530					535					540					
gta	atc	ctt	atg	gcc	att	gct	ttc	act	ctt	gct	aca	cga	tgg	ttt	aga	1680
Val	Ile	Leu	Met	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Arg	Trp	Phe	Arg	
545					550					555					560	
cgg	agc	ctc	att	aag	ttg	ccc	aaa	cct	ttt	gat	aga	ctc	act	ggc	ttc	1728
Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	
				565					570					575		
aat	gca	ttc	tgg	tat	tca	cac	cac	ctt	ctt	gtc	att	gtc	tac	atc	cta	1776
Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	His	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	
			580					585					590			
ctg	atc	atc	cat	ggc	acg	ttc	ctc	ttc	ctt	gtg	cat	aaa	tgg	tac	tcc	1824
Leu	Ile	Ile	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu	Val	His	Lys	Trp	Tyr	Ser	
		595					600					605				
aag	acg	acg	tgg	atg	tat	cta	gca	gtt	cct	gtg	ctt	ctc	tac	gca	ggg	1872
Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Gly	
	610					615				620						
gaa	aga	act	ctt	aga	ttc	ttc	cgg	tca	ggc	ttg	tac	act	gtc	cgg	ctt	1920
Glu	Arg	Thr	Leu	Arg	Phe	Phe	Arg	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Leu	
625					630					635					640	
ctg	aaa	gta	gca	ata	tat	cct	gga	aat	gtc	ctc	act	cta	caa	atg	tct	1968
Leu	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Gln	Met	Ser	
				645					650					655		

aag	cct	cct	caa	ttt	cga	tac	aaa	agt	gga	caa	tat	atg	ttt	gtc	cag	2016
Lys	Pro	Pro	Gln	Phe	Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Gln	
			660					665					670			
tgt	cca	gct	gtt	tct	cca	ttc	gag	tgg	cat	cca	ttt	tcc	att	act	tca	2064
Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	
		675					680					685				
gct	cct	ggg	gat	gac	tac	ttg	agc	att	cac	atc	cgg	caa	ctt	ggt	gac	2112
Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ile	His	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Asp	
	690					695					700					
tgg	act	caa	gaa	ctc	aag	cgg	gtc	ttt	tct	gag	gct	tgc	gag	cgg	cca	2160
Trp	Thr	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Arg	Pro	
705					710					715					720	
gag	gct	gga	aag	agt	ggc	ctg	ctc	aga	gct	gac	gaa	aac	act	aag	aaa	2208
Glu	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys	Lys	
			725					730					735			
agt	ttg	cca	aag	cta	tta	ata	gat	gga	cct	tac	gga	gct	cca	gca	caa	2256
Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	
		740					745						750			
gat	tac	cga	aaa	tat	gat	gtc	ttg	ctg	ctt	gtt	ggt	ctt	ggc	att	gga	2304
Asp	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	
		755				760						765				
gca	acg	ccg	ttc	ata	agt	atc	ctg	aaa	gac	ttg	ctc	gtt	aac	atc	gtg	2352
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Val	Asn	Ile	Val		
	770					775					780					
aaa	atg	gag	gag	caa	gca	gat	tta	gcc	tca	gat	ttc	agt	ggg	aac	tca	2400
Lys	Met	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Ser	
785					790					795					800	
gac	atg	agc	gtt	gcg	aca	agt	gaa	caa	cca	gct	ctc	aac	aag	att	tct	2448
Asp	Met	Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Ser	
			805						810					815		
ctg	aaa	agg	aga	aag	agc	act	cta	aga	acc	aca	aat	gca	tat	ttt	tat	2496
Leu	Lys	Arg	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	Arg	Thr	Thr	Asn	Ala	Tyr	Phe	Tyr	
		820						825					830			
tgg	gtg	acc	cgg	gag	caa	gga	tca	ttt	gat	tgg	ttc	aaa	ggc	gtt	atg	2544
Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met	
		835				840						845				
aac	gaa	gtg	gct	gaa	ctt	gat	caa	agg	ggg	gtc	atc	gag	atg	cat	aac	2592
Asn	Glu	Val	Ala	Glu	Leu	Asp	Gln	Arg	Gly	Val	Ile	Glu	Met	His	Asn	
	850					855					860					
tac	ttg	acg	agt	gtt	tat	gag	gaa	ggg	gat	gct	cgt	tca	gct	ctc	att	2640
Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	
	865				870					875					880	
acc	atg	gtc	cag	gca	ctt	aac	cat	gct	aag	aat	ggg	gtt	gat	att	gta	2688
Thr	Met	Val	Gln	Ala	Leu	Asn	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	
			885						890					895		
tca	ggc	acc	agg	gtg	agg	aca	cat	ttt	gct	agg	cca	aat	tgg	aag	aaa	2736
Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Thr	His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Lys	Lys	
		900						905					910			
gta	ttt	tcc	aag	acc	tta	acc	aag	cat	gca	aat	gca	aga	ata	ggg	gtt	2784
Val	Phe	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	Lys	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Ile	Gly	Val	
		915					920						925			

ttc tac tgt ggt gca ccc gta tta gca aaa gaa ctc agc aaa ctc tgc 2832
 Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys
 930 935 940

aaa gag tat aat caa aag ggt gca aca aag ttc gag ttt cac aaa gaa 2880
 Lys Glu Tyr Asn Gln Lys Gly Ala Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu
 945 950 955 960

cat ttt tag 2889
 His Phe

<210> 6

<211> 962

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 6

Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Asp Phe Ser Gly Glu Leu Ser Pro Gly Ala Asp Ser
 20 25 30

Gly Tyr Asn Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Thr Leu
 35 40 45

Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala
 50 55 60

Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala Pro Asp Leu Pro Ala Gly Val Gly Ile
 65 70 75 80

Ser Gly Val Ser Ile Glu Thr Pro Thr Ser Ala Ser Val Ser Glu Ser
 85 90 95

Arg Ser Pro Thr Ile Arg Arg Ser Ser Ser Ser Lys Leu Arg Gln Phe
 100 105 110

Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Arg Gln Phe Ser
 115 120 125

Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly His
 130 135 140

Ala Ser Arg Ala Phe Ser Pro Ser Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val Val
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu Arg
 165 170 175

Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Arg Ala
 180 185 190

Leu Arg Arg Leu Lys Phe Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp Asn
 195 200 205

Glu Val Glu Asn Asn Phe Ser Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu Tyr
 210 215 220

Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe
 225 230 235 240

Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys Val
 245 250 255

Asp Lys Ile Ser Lys Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr
 260 265 270

Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Ser Phe Asp Met Val Asp
 275 280 285

Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Arg	Ile	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Ile	Ile	290	295	300
Met	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Gln	Ala	305	310	315
Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Glu	Arg	Leu	325	330	335
Gly	Tyr	Ile	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	340	345	350
Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ala	Leu	355	360	365
Ser	Gln	Asn	Leu	His	Gly	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Pro	Ile	Lys	Arg	Met	370	375	380
Ser	Thr	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	385	390	395
Val	Leu	Thr	Leu	Trp	Ile	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Lys	405	410	415
Phe	Tyr	Gln	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ser	Ala	Phe	Arg	Val	Met	Gly	Tyr	Cys	420	425	430
Leu	Val	Thr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Phe	Asn	Met	Ala	435	440	445
Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Ser	450	455	460
Thr	Lys	Leu	Ser	His	Phe	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	Phe	His	465	470	475
Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Leu	His	Ala	Gly	485	490	495
Asn	His	Leu	Val	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Ile	His	Ala	Asp	Asp	Gln	500	505	510
Asp	Tyr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Phe	Gly	Gln	Ser	Lys	Pro	Gly	515	520	525
Tyr	Ile	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Met	530	535	540
Val	Ile	Leu	Met	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Arg	Trp	Phe	Arg	545	550	555
Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	565	570	575
Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	His	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	580	585	590
Leu	Ile	Ile	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu	Val	His	Lys	Trp	Tyr	Ser	595	600	605
Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Gly	610	615	620
Glu	Arg	Thr	Leu	Arg	Phe	Phe	Arg	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Leu	625	630	635
Leu	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Gln	Met	Ser	645	650	655
Lys	Pro	Pro	Gln	Phe	Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Gln	660	665	670

Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser
		675					680					685			
Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ile	His	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Asp
		690				695					700				
Trp	Thr	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Arg	Pro
705					710					715					720
Glu	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys	Lys
				725					730					735	
Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln
			740					745					750		
Asp	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly
		755					760					765			
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Ile	Val
		770				775						780			
Lys	Met	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Ser
785					790					795					800
Asp	Met	Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Ser
				805					810					815	
Leu	Lys	Arg	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	Arg	Thr	Thr	Asn	Ala	Tyr	Phe	Tyr
			820					825					830		
Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met
		835				840						845			
Asn	Glu	Val	Ala	Glu	Leu	Asp	Gln	Arg	Gly	Val	Ile	Glu	Met	His	Asn
		850				855					860				
Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile
865					870					875					880
Thr	Met	Val	Gln	Ala	Leu	Asn	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val
			885						890					895	
Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Thr	His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Lys	Lys
			900					905					910		
Val	Phe	Ser	Lys	Thr	Leu	Thr	Lys	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Ile	Gly	Val
		915					920					925			
Phe	Tyr	Cys	Gly	Ala	Pro	Val	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Cys
		930				935					940				
Lys	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Gly	Ala	Thr	Lys	Phe	Glu	Phe	His	Lys	Glu
945					950					955					960
His	Phe														

<210> 7

<211> 3733

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (92)..(2980)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 7

ggcacgagaa taaccaaac ttttggtcag gcttctgcag aaaactctgt tttcaacata 60

tattttatttta ttgtgcttttg atttgggaca a atg agg ggt tta cct ggg cat	112
Met Arg Gly Leu Pro Gly His	
1 5	
gaa cgc cgg tgg acg tcg gat acg gta tct tcc ggc aag gat tta agt	160
Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser	
10 15 20	
ggg gag tca tcg ccg gga act gat tcc ggg aat att tcc ggt ttt gct	208
Gly Glu Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala	
25 30 35	
tcc gag gag ttt gtt gaa gtt ata ctt gat ctt cag gat gat gat acg	256
Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Ile Leu Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr	
40 45 50 55	
att att cta cgg agc gtt gaa ccg gct act gta atc aac att gat gct	304
Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala	
60 65 70	
tct gat cct gct acc gga gtc ggt att ggt gga gta tcg att gaa act	352
Ser Asp Pro Ala Thr Gly Val Gly Ile Gly Gly Val Ser Ile Glu Thr	
75 80 85	
ccg gcg tcg ctg act tcg acg tcg gga act cga tcg ccg acg atg cgt	400
Pro Ala Ser Leu Thr Ser Thr Ser Gly Thr Arg Ser Pro Thr Met Arg	
90 95 100	
cgg agt aca tcg aat aaa tta cgt cag ttt tca cag gag ttg aaa gct	448
Arg Ser Thr Ser Asn Lys Leu Arg Gln Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala	
105 110 115	
gag gct gtc gcg aaa gcg aag cat ttc tcg caa gag ctt aaa gcg gag	496
Glu Ala Val Ala Lys Ala Lys His Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu	
120 125 130 135	
cta agg aga ttc tca tgg agc cat gga cat gcg tct cgc act ttt tcg	544
Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly His Ala Ser Arg Thr Phe Ser	
140 145 150	
ccg gcg tcg ttt ttc caa aac gcc gtc gtc ggt aca ggc aac ggt gta	592
Pro Ala Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val Val Gly Thr Gly Asn Gly Val	
155 160 165	
gat tcg gct tta gca gct cga gca tta cga cgg cag cgc gct cag ctc	640
Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu Arg Arg Gln Arg Ala Gln Leu	
170 175 180	
gat cgg act cgt tcc agc gct cac aag gct ctt cgt gga ctc aaa ttc	688
Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Lys Ala Leu Arg Gly Leu Lys Phe	
185 190 195	
atc agc aat aac aaa act aac gga tgg aat gaa gtt gaa aac aat ttt	736
Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp Asn Glu Val Glu Asn Asn Phe	
200 205 210 215	
gct aag ctc gct aaa gac ggt tac ctt tat cgc tcc gat ttc gca caa	784
Ala Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln	
220 225 230	
tgc atc ggt atg aag gat tca aag gaa ttt gca ttg gaa ttg ttt gat	832
Cys Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp	
235 240 245	
gct ttg agt aga aga aga aga ttg aag gtt gat aag att agc aaa gag	880
Ala Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys Val Asp Lys Ile Ser Lys Glu	
250 255 260	

gaa ttg tat gag tat tgg tct caa atc acc gat cag agt ttc gat tct	928
Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr Asp Gln Ser Phe Asp Ser	
265 270 275	
cgg ctt cag atc ttc ttc gac atg gtg gac aag aat gaa gat ggt cga	976
Arg Leu Gln Ile Phe Phe Asp Met Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg	
280 285 290 295	
att ggt gaa gaa gaa gta aaa gag atc atc atg cta agt gcc tct gca	1024
Ile Gly Glu Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala	
300 305 310	
aac aaa tta tca aga tta aaa gaa caa gca gag gag tat gca gct ctg	1072
Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu	
315 320 325	
atc atg gaa gaa tta gat cct gaa aga ctt ggc tac att gag cta tgg	1120
Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp	
330 335 340	
cag ctg gaa acg ctt ctc ctc caa aag gac act tac ctc aac tac agt	1168
Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser	
345 350 355	
caa gca cta agc tac aca agc caa gct ttg agc caa aac ctg caa ggg	1216
Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly	
360 365 370 375	
ttg agg aag aga agc cca ata aga aga atg agc aca aaa ctt gtc tat	1264
Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg Arg Met Ser Thr Lys Leu Val Tyr	
380 385 390	
tca ctg caa gag aat tgg aag aga att tgg gtt ctg gtc ttg tgg att	1312
Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Val Leu Trp Ile	
395 400 405	
ttg ata atg att gga ctt ttt ctt tgg aag ttc tat ctg tac aaa cag	1360
Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys Phe Tyr Leu Tyr Lys Gln	
410 415 420	
aaa agt gca ttt caa gtt atg ggt tat tgc ctt cta aca gct aag ggt	1408
Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly	
425 430 435	
gct gct gag act cta aag ttc aac atg gct ttg ata ttg ttg cca gtt	1456
Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val	
440 445 450 455	
tgc agg aac acc att aca ttc ctc agg tct act aaa ttg agt tgt ttt	1504
Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu Arg Ser Thr Lys Leu Ser Cys Phe	
460 465 470	
gta ccc ttt gat gac aac atc aac ttc cac aag act gtt gct gca gcc	1552
Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Val Ala Ala Ala	
475 480 485	
att gtt act ggt atc ata ctc cat gcc ggt aat cat ctt gta tgt gat	1600
Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn His Leu Val Cys Asp	
490 495 500	
ttc cca aag ctt ata cat gca aat aat acg aat tat cag aaa tat ttg	1648
Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn Asn Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Leu	
505 510 515	
gtg aat gat ttt ggc cca agc cag cct cag tac ata gat ctt gtt aaa	1696
Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln Pro Gln Tyr Ile Asp Leu Val Lys	
520 525 530 535	

gga	gtg	gag	ggt	gtg	aca	gga	ata	ata	atg	gta	atc	ctc	atg	gcc	att	1744
Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Met	Val	Ile	Leu	Met	Ala	Ile	
				540					545					550		
gct	ttc	act	ctt	gca	acg	cga	tgg	ttt	agg	cgg	agc	ctc	att	aag	ttt	1792
Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Arg	Trp	Phe	Arg	Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Phe	
			555				560						565			
ccc	aaa	cct	ttt	gat	aga	ctc	act	ggt	ttc	aat	gcg	ttc	tgg	tac	tcg	1840
Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	
		570					575					580				
cac	cac	ctt	ctc	atc	att	gtc	tac	atc	gta	ctg	atc	atc	cat	ggc	aca	1888
His	His	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Tyr	Ile	Val	Leu	Ile	Ile	His	Gly	Thr	
	585					590					595					
ttc	ctc	tac	ctt	gtg	cat	aac	tgg	tac	tcc	aaa	acg	aca	tgg	atg	tat	1936
Phe	Leu	Tyr	Leu	Val	His	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	
600					605				610					615		
cta	gca	gtt	cct	gta	ctt	ctc	tac	gca	ggg	gaa	aga	act	ctt	aga	ttc	1984
Leu	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Gly	Glu	Arg	Thr	Leu	Arg	Phe	
			620						625					630		
ttc	cga	tca	ggc	tta	tat	aca	gtc	cgg	ctt	cta	aaa	gta	gca	ata	tat	2032
Phe	Arg	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	
			635					640					645			
cct	gga	aat	gtc	ctt	act	ctg	caa	atg	tct	aag	cct	ccg	caa	ttt	cga	2080
Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Gln	Met	Ser	Lys	Pro	Pro	Gln	Phe	Arg	
		650					655					660				
tac	aag	agt	gga	caa	tat	atg	ttt	gtc	cag	tgt	cca	gct	gtt	tct	cca	2128
Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Gln	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	
	665					670					675					
ttc	gag	tgg	cat	cca	ttt	tcc	att	act	tca	gct	cct	ggg	gat	gac	tac	2176
Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	
680					685					690				695		
ttg	agc	att	cat	atc	cga	caa	ctt	ggt	gac	tgg	act	caa	gaa	ctc	aag	2224
Leu	Ser	Ile	His	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Gln	Glu	Leu	Lys	
				700					705					710		
cgg	gtg	ttt	tcc	gag	gct	tgc	gag	cag	cca	gag	gct	gga	aag	agt	ggc	2272
Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Gln	Pro	Glu	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	
			715					720					725			
ctg	ctc	aga	gct	gac	gaa	aac	acc	aaa	aca	agt	ttg	cca	aag	cta	ttg	2320
Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	
			730					735					740			
ata	gat	gga	cct	tat	gga	gct	cca	gca	caa	gat	tac	cga	aag	tat	gat	2368
Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Asp	
	745					750					755					
gtc	tta	ctg	ctt	gtt	ggt	ctt	ggc	att	gga	gca	act	ccc	ttt	ata	agt	2416
Val	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Ser	
760					765					770				775		
atc	ctg	aaa	gac	ttg	ctc	aaa	aac	atc	gtc	aca	atg	gag	gag	caa	gca	2464
Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Met	Glu	Glu	Gln	Ala	
			780						785					790		
gat	tta	gtc	tcg	gat	ttt	tca	ggg	aac	tca	gac	atg	agc	gct	gca	aca	2512
Asp	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Ser	Asp	Met	Ser	Ala	Ala	Thr	
			795					800						805		

```

agt gaa caa cca gct ctc aac aag att tct cca aaa aag aga aag agt 2560
Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser
      810                      815                      820

act cta aaa acc aca aat gca tat ttt tat tgg gtg acc cgg gag caa 2608
Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln
      825                      830                      835

gga tca ttt gat tgg ttc aaa ggt gtt atg aac gaa gtg gct gaa ctt 2656
Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu
      840                      845                      850                      855

gat caa agg ggg gtc atc gag atg cat aac tac tta acg agt gtt tat 2704
Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr
      860                      865                      870

gag gaa ggg gat gca cgt tca gct ctc att acc atg gtc cag gcg ctt 2752
Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu
      875                      880                      885

aac cat gct aag aat ggg gtt gat att gta tca ggc acc agt gtg agg 2800
Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Ser Val Arg
      890                      895                      900

aca cat ttt gcc aga ccg aat tgg agg aaa gta ttt tcc aag acc tta 2848
Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu
      905                      910                      915

acc aag cat gca aat gca aga ata gga gtt ttc tac tgc ggt gca ccc 2896
Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro
      920                      925                      930                      935

ata tta gct aaa gaa ctc agc aaa ctc tgc aaa gag ttt aac caa aag 2944
Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys
      940                      945                      950

ggc aca acg aag ttc gag ttt cac aaa gaa cat ttt tagaaggccc 2990
Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
      955                      960

tggagtacaa ttaatcttgc atcaacggta cacacatcgg taaaccagta tttaccacat 3050
ctatctttgg tacctgattt gatgattcta ctgaagacat aacattagta aggaataagt 3110
cagagacaaa ttgtacataa taggaggaag cacatttaca gagaaaatac ataccaatat 3170
gatatgtgta taggttttgt atattcagtc atctgttata acataccaaa cttcagaact 3230
ccaaaaggga gactctgctt tggctctgatg gcttagaata tgggagggaa aaaaagacga 3290
caattgaatg gtcacgatac acatgaagaa tgagaatatt gggaaacagc taataagaag 3350
ttgaccttct tgataaagaa acactatgaa aatggcaagc atgaaaggac agacaatcat 3410
ggcttggatg gggaaaacaa aatacaattt tgaaagaaga agataatatt agtaggagta 3470
gtgggggact gatagctttg ttggtggaac ttataatggg gctaagggaa tccttccaaa 3530
aaatgtctat gtagtaacta ctttttcttt tgctttgtga gtattttttg gggatatttta 3590
atatactact tattagataa gaggatagaa aatacgtgta tatgcaattc ttattagtaa 3650
agtttatctg tagtagttct ttaatctgga gaaagggtact atcaaaggaa atatctcatc 3710
gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3733

<210> 8
<211> 963
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

```

<400> 8

Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	His	Glu	Arg	Arg	Trp	Thr	Ser	Asp	Thr	Val
1				5					10					15	
Ser	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Asp	Ser
			20					25					30		
Gly	Asn	Ile	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Glu	Glu	Phe	Val	Glu	Val	Ile	Leu
		35					40					45			
Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Ile	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala
	50					55					60				
Thr	Val	Ile	Asn	Ile	Asp	Ala	Ser	Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Ile
	65				70					75					80
Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Glu	Thr	Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Gly
				85					90					95	
Thr	Arg	Ser	Pro	Thr	Met	Arg	Arg	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Arg	Gln
			100					105					110		
Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Lys	His	Phe
		115					120					125			
Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	His	Gly
	130					135					140				
His	Ala	Ser	Arg	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Ala	Val
	145				150					155					160
Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Val	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu
				165					170					175	
Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	His	Lys
			180					185					190		
Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ser	Asn	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly	Trp
		195					200					205			
Asn	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Phe	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Leu
	210					215					220				
Tyr	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu
	225				230					235					240
Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	Lys
				245					250					255	
Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Ser	Gln	Ile
			260					265					270		
Thr	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Phe	Phe	Asp	Met	Val
		275					280					285			
Asp	Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Arg	Ile	Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Ile
	290					295					300				
Ile	Met	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Gln
	305				310					315					320
Ala	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Glu	Arg
				325					330					335	
Leu	Gly	Tyr	Ile	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys
			340					345					350		
Asp	Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ala
			355				360						365		

Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser	Pro	Ile	Arg	Arg
370						375					380				
Met	Ser	Thr	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Trp	Lys	Arg	Ile
385					390					395					400
Trp	Val	Leu	Val	Leu	Trp	Ile	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp
				405					410					415	
Lys	Phe	Tyr	Leu	Tyr	Lys	Gln	Lys	Ser	Ala	Phe	Gln	Val	Met	Gly	Tyr
			420					425					430		
Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Phe	Asn	Met
			435				440					445			
Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Arg
	450					455					460				
Ser	Thr	Lys	Leu	Ser	Cys	Phe	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	Phe
465					470					475					480
His	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Leu	His	Ala
				485					490					495	
Gly	Asn	His	Leu	Val	Cys	Asp	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	His	Ala	Asn	Asn
			500					505					510		
Thr	Asn	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Val	Asn	Asp	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Pro
			515				520					525			
Gln	Tyr	Ile	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ile
	530					535					540				
Met	Val	Ile	Leu	Met	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Arg	Trp	Phe
545					550					555					560
Arg	Arg	Ser	Leu	Ile	Lys	Phe	Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly
				565					570					575	
Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	His	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Tyr	Ile
			580					585					590		
Val	Leu	Ile	Ile	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Tyr	Leu	Val	His	Asn	Trp	Tyr
		595					600					605			
Ser	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala
	610					615					620				
Gly	Glu	Arg	Thr	Leu	Arg	Phe	Phe	Arg	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg
625					630					635					640
Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Gln	Met
				645					650					655	
Ser	Lys	Pro	Pro	Gln	Phe	Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val
			660					665					670		
Gln	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr
			675				680					685			
Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ile	His	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly
	690					695					700				
Asp	Trp	Thr	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Gln
705					710					715					720
Pro	Glu	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys
				725					730					735	
Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala
			740					745					750		

Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile
 755 760 765
 Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn Ile
 770 775 780
 Val Thr Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly Asn
 785 790 795 800
 Ser Asp Met Ser Ala Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile
 805 810 815
 Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe
 820 825 830
 Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val
 835 840 845
 Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His
 850 855 860
 Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu
 865 870 875 880
 Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile
 885 890 895
 Val Ser Gly Thr Ser Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg
 900 905 910
 Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly
 915 920 925
 Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu
 930 935 940
 Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys
 945 950 955 960
 Glu His Phe

<210> 9

<211> 3316

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> CDS

<222> (146)..(3112)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 9

cgccactcgt gccgaattcg gcacgaggct ctgaaaaact tttcatacaa agccaatcta 60
 tttctctctc tttcttttgg tcaggcttct acagaaaact ctgttttcaa cgtatatatta 120
 tttattgtca tttgatttgg gacag atg agg ggt tta cct ggg cat gaa cgc 172
 Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg
 1 5
 cgg tgg acg tcg gat acg gtg tct tcc ggg aag gat tta agt ggt gag 220
 Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser Gly Glu
 10 15 20 25
 tca tcg ccg gga act gat tcc ggg aat att tcc ggt ttt gct tcg gag 268
 Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala Ser Glu
 30 35 40

gag	ttt	gtt	gaa	gtt	ata	ctt	gat	ctt	cag	gat	gat	gat	acg	att	att	316
Glu	Phe	Val	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Ile	
		45						50					55			
tta	cgg	agc	gtt	gaa	ccg	gct	act	gta	atc	aac	att	gat	ggg	tct	gat	364
Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Thr	Val	Ile	Asn	Ile	Asp	Gly	Ser	Asp	
		60					65					70				
cct	gct	tcc	gga	gtc	ggg	att	ggg	gga	gca	tcg	att	gaa	act	ccg	gcg	412
Pro	Ala	Ser	Gly	Val	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	Pro	Ala	
		75				80					85					
tcg	gtg	acg	tcg	acg	tcg	gaa	act	cga	tcg	ccg	atg	atg	cgt	ccg	agt	460
Ser	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Arg	Ser	Pro	Met	Met	Arg	Arg	Ser	
		90			95					100					105	
aca	tct	aat	aag	ttt	cgt	cag	ttt	tca	cag	gag	ttg	aaa	gct	gag	gct	508
Thr	Ser	Asn	Lys	Phe	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	
				110					115					120		
gtt	gcg	aaa	gcg	aag	cat	ttc	tcg	caa	gag	ctt	aaa	gcg	gag	cta	agg	556
Val	Ala	Lys	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Arg	
			125					130					135			
aga	ttc	tca	tgg	agc	cat	gga	cat	gcg	tct	cgt	gct	ttt	tcg	ccg	gcg	604
Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	His	Gly	His	Ala	Ser	Arg	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	
		140				145						150				
tcg	ttt	ttc	caa	aac	gct	gtc	gtc	gga	aca	ggc	aac	ggg	gta	gac	tcg	652
Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Ala	Val	Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Val	Asp	Ser	
	155				160						165					
gct	tta	gcg	gct	cga	gca	tta	cgt	ccg	cag	cgt	gct	cag	ctc	gac	ccg	700
Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	
	170				175					180					185	
act	cgt	tcc	agc	gca	cac	aag	gct	ctt	cgt	gga	ctc	aaa	ttc	atc	agc	748
Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ser	
				190					195					200		
aat	aac	aaa	act	aac	gga	tgg	aat	gaa	gtt	gaa	aac	aat	ttc	gct	aag	796
Asn	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly	Trp	Asn	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Phe	Ala	Lys	
			205					210					215			
ctc	gct	aaa	gac	ggg	tac	ctt	tat	cgt	tcc	gat	ttc	gca	caa	tgc	atc	844
Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln	Cys	Ile	
		220				225						230				
ggg	cag	tac	tca	cgc	ccg	cga	tca	cta	cag	ttt	aat	tat	aga	tta	att	892
Gly	Gln	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Ser	Leu	Gln	Phe	Asn	Tyr	Arg	Leu	Ile	
		235				240					245					
aca	tta	att	ttg	att	aat	tat	ttg	gtt	aaa	ggg	atg	aag	gat	tca	aag	940
Thr	Leu	Ile	Leu	Ile	Asn	Tyr	Leu	Val	Lys	Gly	Met	Lys	Asp	Ser	Lys	
		250			255					260					265	
gaa	ttt	gcg	ttg	gaa	ttg	ttt	gat	gct	tta	agt	aga	aga	aga	aga	ttg	988
Glu	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	
			270					275						280		
aag	gtt	gat	aag	att	agc	caa	gag	gaa	ttg	tat	gag	tat	tgg	tct	caa	1036
Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Gln	Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Ser	Gln	
			285					290					295			
atc	acc	gat	cag	agt	ttc	gat	tct	cgg	ctt	cag	atc	ttc	ttc	gac	atg	1084
Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Phe	Phe	Asp	Met	
		300					305					310				

gtg gac aag aat gaa gat ggt cga att ggt gaa gaa gaa gta aaa gag	1132
Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Gly Glu Glu Glu Val Lys Glu	
315 320 325	
atc atc atg cta agt gcc tct gca aac aaa tta tca aga tta aaa gaa	1180
Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu	
330 335 340 345	
caa gca gag gag tat gca gct ctg atc atg gaa gaa tta gat cct gaa	1228
Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu	
350 355 360	
aga ctt ggc tac att gag cta tgg cag ctg gaa aca ctt ctc ctc caa	1276
Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln	
365 370 375	
aag gac act tac ctc aac tac agt caa gca cta agc tac aca agc caa	1324
Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln	
380 385 390	
gct ttg agc caa aat ctg caa ggg ttg agg aag aga agc cca ata aga	1372
Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg	
395 400 405	
aga atg agc aca aaa ctt gtc tat tca ctg caa gag aat tgg aag aga	1420
Arg Met Ser Thr Lys Leu Val Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg	
410 415 420 425	
att tgg gtt ctg gtc ttg tgg att ttg ata atg att gga ctt ttt ctt	1468
Ile Trp Val Leu Val Leu Trp Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu	
430 435 440	
tgg aag ttc tat cag tac aaa cag aaa agt gca ttt caa gtc atg ggt	1516
Trp Lys Phe Tyr Gln Tyr Lys Gln Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly	
445 450 455	
tat tgc ctt cta aca gct aag ggt gct gct gag act ctc aag ttc aac	1564
Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn	
460 465 470	
atg gct tta ata ttg ttg cca gta tgc agg aac acc att aca ttc ctc	1612
Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu	
475 480 485	
agg tct act aaa ttg agc tgt ttt gta ccc ttt gat gac aac ata aac	1660
Arg Ser Thr Lys Leu Ser Cys Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn	
490 495 500 505	
ttt cac aag act gtt gct gca gcc att gtc act ggt atc ata ctc cat	1708
Phe His Lys Thr Val Ala Ala Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His	
510 515 520	
gcc ggt aat cac ctt gta tgt gat ttc cca aag ctt ata cat gca aat	1756
Ala Gly Asn His Leu Val Cys Asp Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn	
525 530 535	
agt acg aat tat cag aaa tat ttg gtg aat gat ttt ggc cca agc cag	1804
Ser Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Leu Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln	
540 545 550	
cct cag tac ata gat ctt gtt aaa gga gtg gag ggt gtg act gga ata	1852
Pro Gln Tyr Ile Asp Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile	
555 560 565	
gtt atg gta atc ctc atg gcc att gct ttc act ctt gca acg cga tgg	1900
Val Met Val Ile Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp	
570 575 580 585	

ttt agg cgg agc ctc att aag tta ccc aaa cct ttt gat aga ctc act	1948
Phe Arg Arg Ser Leu Ile Lys Leu Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr	
590 595 600	
ggt ttc aat gcg ttc tgg tac tcg cac cac ctt ctc atc att gtc tac	1996
Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Leu Ile Ile Val Tyr	
605 610 615	
atc gta ctg atc atc cat ggc aca ttc ctc tac ctt gtg cat aac tgg	2044
Ile Val Leu Ile Ile His Gly Thr Phe Leu Tyr Leu Val His Asn Trp	
620 625 630	
tac tcc aaa acg aca tgg atg tat ata gca gtt cct gta ctt ctt tac	2092
Tyr Ser Lys Thr Thr Trp Met Tyr Ile Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr	
635 640 645	
gca ggg gaa aga act ctt aga ttc ttc cga tca ggc tta tac agt gtc	2140
Ala Gly Glu Arg Thr Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Ser Val	
650 655 660 665	
cgg ctt cta aaa gta gca ata tat cct gga aat gtc ctt act ctg caa	2188
Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln	
670 675 680	
atg tct aag cct ccg caa ttt cga tac aag agt gga cag tat atg ttt	2236
Met Ser Lys Pro Pro Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe	
685 690 695	
gtc cag tgt cca gct gtt tct cca ttc gag tgg cat cca ttt tcc att	2284
Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile	
700 705 710	
act tca gct cct ggg gat gac tac ttg agc att cat atc cga caa ctt	2332
Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu	
715 720 725	
ggt gac tgg act caa gaa ctc aag cga gtg ttt tcc gag gct tgc gag	2380
Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu	
730 735 740 745	
cag cca gag gct gga aag agt ggc ctg ctc aga gct gac gaa aac acc	2428
Gln Pro Glu Ala Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr	
750 755 760	
aaa aca agt ttg cca aag cta tta ata gat gga cct tat gga gct cca	2476
Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro	
765 770 775	
gca caa gat tac cgg aag tat gat gtc tta ctg ctt gtt ggt ctt ggc	2524
Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly	
780 785 790	
att gga gca act ccc ttt ata agt atc ctg aaa gac ttg ctc aaa aac	2572
Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn	
795 800 805	
atc gtc gca atg gag gag caa gca gat tta gtc tcg gat ttc agt gga	2620
Ile Val Ala Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly	
810 815 820 825	
aac tcg gac atg agt gct gca aca agt gaa caa cca gct ctc aac aag	2668
Asn Ser Asp Met Ser Ala Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys	
830 835 840	
att tct cca aaa aag aga aag agt act cta aaa acc aca aat gca tat	2716
Ile Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr	
845 850 855	

```

ttt tat tgg gtg acc cgg gag caa gga tca ttt gat tgg ttc aaa ggt 2764
Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly
      860      865      870

gtt atg aat gaa gtg gct gaa ctt gat caa agg ggt gtc atc gag atg 2812
Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met
      875      880      885

cat aac tac ttg acg agt gtt tat gag gaa ggg gat gca cgt tca gct 2860
His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala
      890      895      900      905

ctc att acc atg gtc cag gca ctt aac cat gct aag aat ggg gtt gat 2908
Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp
      910      915      920

att gta tca ggc acc agt gtg agg aca cat ttc gcc agg ccg aat tgg 2956
Ile Val Ser Gly Thr Ser Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp
      925      930      935

agg aaa gta ttt tcc aag acc tta acc aag cat gca aat gca aga ata 3004
Arg Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile
      940      945      950

gga gtt ttc tac tgt ggt gca ccc ata tta gct aaa gaa ctc agc caa 3052
Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Gln
      955      960      965

ctc tgc aaa gag ttt aac caa aag ggc aca aca aag ttc gag ttt cac 3100
Leu Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His
      970      975      980      985

aaa gaa cat ttt tagaagggcc tggagtatga ttaatcttgc atcaacggta 3152
Lys Glu His Phe

cacacatcta tcttcggtac cttatttgat tattctactg aagagataac attagtaagg 3212
aataagtcag agataaattg tacataatag ggaagaagac tatttcaaga gaaaatacat 3272
accaataaga tgtgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaactcgt gccg 3316

<210> 10
<211> 989
<212> PRT
<213> Lycopersicon esculentum

<400> 10
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val
  1          5          10          15

Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser Gly Glu Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser
      20          25          30

Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Ile Leu
      35          40          45

Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala
      50          55          60

Thr Val Ile Asn Ile Asp Gly Ser Asp Pro Ala Ser Gly Val Gly Ile
      65          70          75          80

Gly Gly Ala Ser Ile Glu Thr Pro Ala Ser Val Thr Ser Thr Ser Glu
      85          90          95

Thr Arg Ser Pro Met Met Arg Arg Ser Thr Ser Asn Lys Phe Arg Gln
      100          105          110

Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Lys His Phe
      115          120          125

```

Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	His	Gly
130						135					140				
His	Ala	Ser	Arg	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Ala	Val
145					150					155					160
Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Val	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu
				165					170					175	
Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	His	Lys
			180					185					190		
Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ser	Asn	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly	Trp
		195					200				205				
Asn	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Phe	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Leu
	210					215					220				
Tyr	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Gln	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg
225				230						235					240
Ser	Leu	Gln	Phe	Asn	Tyr	Arg	Leu	Ile	Thr	Leu	Ile	Leu	Ile	Asn	Tyr
				245					250					255	
Leu	Val	Lys	Gly	Met	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe
			260					265					270		
Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Gln
		275					280					285			
Glu	Glu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Ser	Gln	Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp
	290					295					300				
Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Phe	Phe	Asp	Met	Val	Asp	Lys	Asn	Glu	Asp	Gly
305					310					315					320
Arg	Ile	Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Ile	Ile	Met	Leu	Ser	Ala	Ser
				325					330					335	
Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Gln	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala
			340					345					350		
Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ile	Glu	Leu
		355					360					365			
Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr
	370					375					380				
Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln
385					390					395					400
Gly	Leu	Arg	Lys	Arg	Ser	Pro	Ile	Arg	Arg	Met	Ser	Thr	Lys	Leu	Val
				405					410					415	
Tyr	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	Val	Leu	Val	Leu	Trp
			420					425					430		
Ile	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Lys	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Lys
	435					440					445				
Gln	Lys	Ser	Ala	Phe	Gln	Val	Met	Gly	Tyr	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Lys
	450					455					460				
Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Phe	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro
465					470					475					480
Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Arg	Ser	Thr	Lys	Leu	Ser	Cys
				485					490					495	
Phe	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	Phe	His	Lys	Thr	Val	Ala	Ala
			500					505					510		

Ala	Ile	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Leu	His	Ala	Gly	Asn	His	Leu	Val	Cys
		515					520					525			
Asp	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	His	Ala	Asn	Ser	Thr	Asn	Tyr	Gln	Lys	Tyr
	530					535					540				
Leu	Val	Asn	Asp	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Pro	Gln	Tyr	Ile	Asp	Leu	Val
545					550					555					560
Lys	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Met	Val	Ile	Leu	Met	Ala
				565					570					575	
Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Arg	Trp	Phe	Arg	Arg	Ser	Leu	Ile	Lys
			580					585					590		
Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr
		595					600					605			
Ser	His	His	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Tyr	Ile	Val	Leu	Ile	Ile	His	Gly
	610					615					620				
Thr	Phe	Leu	Tyr	Leu	Val	His	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Thr	Trp	Met
625					630					635					640
Tyr	Ile	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Tyr	Ala	Gly	Glu	Arg	Thr	Leu	Arg
				645					650					655	
Phe	Phe	Arg	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Val	Arg	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Ile
			660					665					670		
Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Thr	Leu	Gln	Met	Ser	Lys	Pro	Pro	Gln	Phe
		675					680					685			
Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Gln	Cys	Pro	Ala	Val	Ser
	690					695					700				
Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp
705					710					715					720
Tyr	Leu	Ser	Ile	His	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Gln	Glu	Leu
				725					730					735	
Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Gln	Pro	Glu	Ala	Gly	Lys	Ser
			740					745					750		
Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu
			755				760					765			
Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	Arg	Lys	Tyr
	770					775					780				
Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile
785					790					795					800
Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Met	Glu	Glu	Gln
				805					810					815	
Ala	Asp	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Ser	Asp	Met	Ser	Ala	Ala
			820					825					830		
Thr	Ser	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Ser	Pro	Lys	Lys	Arg	Lys
			835				840					845			
Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Thr	Asn	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu
						855					860				
Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Asn	Glu	Val	Ala	Glu
865					870					875					880
Leu	Asp	Gln	Arg	Gly	Val	Ile	Glu	Met	His	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Val
				885					890						895

Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Met	Val	Gln	Ala
			900					905					910		
Leu	Asn	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Thr	Ser	Val
		915					920					925			
Arg	Thr	His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Arg	Lys	Val	Phe	Ser	Lys	Thr
	930						935				940				
Leu	Thr	Lys	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Ile	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Ala
945					950					955					960
Pro	Ile	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	Leu	Cys	Lys	Glu	Phe	Asn	Gln
				965					970					975	
Lys	Gly	Thr	Thr	Lys	Phe	Glu	Phe	His	Lys	Glu	His	Phe			
			980					985							

<210> 11

<211> 3080

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (15)..(2846)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 11

ccgactttgg	atct	atg	aaa	ccg	ttc	tca	aag	aac	gat	cgg	cga	cgg	tgg		50
		Met	Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Trp		
		1				5					10				
tca	ttt	gat	tca	gtt	tcc	gcc	gga	aaa	acc	gcc	gtc	gga	agt	gca	tca
Ser	Phe	Asp	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Ser
		15				20					25				98
act	tca	ccg	gga	act	gaa	tac	tcc	att	aac	ggc	gat	caa	gag	ttc	gtt
Thr	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Ser	Ile	Asn	Gly	Asp	Gln	Glu	Phe	Val
	30					35					40				146
gaa	gtc	aca	atc	gat	ctt	caa	gac	gat	gac	aca	atc	gtt	ctt	cgt	agc
Glu	Val	Thr	Ile	Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Ser
	45				50					55				60	194
gtc	gag	cca	gca	acc	gcc	att	aat	gtc	atc	gga	gat	atc	tcc	gac	gac
Val	Glu	Pro	Ala	Thr	Ala	Ile	Asn	Val	Ile	Gly	Asp	Ile	Ser	Asp	Asp
				65				70					75		242
aac	acc	gga	ata	atg	act	ccg	gtt	tcg	att	tcg	aga	tct	ccg	acg	atg
Asn	Thr	Gly	Ile	Met	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Thr	Met
			80				85					90			290
aaa	cga	act	tca	tct	aat	cgg	ttc	cga	caa	ttc	tca	caa	gag	ctt	aaa
Lys	Arg	Thr	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys
	95					100					105				338
gcc	gaa	gct	gtg	gcg	aaa	gcg	aaa	cag	tta	tct	cag	gag	ttg	aaa	cga
Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg
	110				115						120				386
ttc	tca	tgg	tct	cgt	tct	ttc	tca	ggc	aac	tta	acc	act	act	agt	acc
Phe	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr
	125				130				135					140	434
gcc	gct	aat	caa	agc	ggc	ggc	gct	ggc	ggc	ggc	ttg	gtg	aac	tcg	gct
Ala	Ala	Asn	Gln	Ser	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Ala
				145				150						155	482

tta gaa gcg cga gcg ttg cga aag caa cgt gct cag tta gat cgg act	530
Leu Glu Ala Arg Ala Leu Arg Lys Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr	
160 165 170	
cgg tct agt gct caa aga gct ctt cgt ggt ttg aga ttc att agc aat	578
Arg Ser Ser Ala Gln Arg Ala Leu Arg Gly Leu Arg Phe Ile Ser Asn	
175 180 185	
aag caa aag aac gtt gat ggt tgg aac gat gtt caa tca aat ttc gaa	626
Lys Gln Lys Asn Val Asp Gly Trp Asn Asp Val Gln Ser Asn Phe Glu	
190 195 200	
aaa ttc gaa aaa aat ggt tac atc tat cgc tcc gat ttc gct caa tgc	674
Lys Phe Glu Lys Asn Gly Tyr Ile Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys	
205 210 215 220	
ata gga atg aaa gat tcg aaa gaa ttt gca ttg gaa ctg ttc gat gca	722
Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala	
225 230 235	
ttg agt aga aga aga tta aaa gta gag aaa atc aat cac gat gag	770
Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys Val Glu Lys Ile Asn His Asp Glu	
240 245 250	
ctt tat gag tat tgg tca caa atc aac gac gag agt ttt gat tct cgt	818
Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Asn Asp Glu Ser Phe Asp Ser Arg	
255 260 265	
ctc cag atc ttc ttc gac ata gtg gac aag aat gaa gat ggg aga att	866
Leu Gln Ile Phe Phe Asp Ile Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile	
270 275 280	
aca gaa gag gaa gta aaa gag ata ata atg ttg agt gca tct gca aat	914
Thr Glu Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn	
285 290 295 300	
aag cta tca aga tta aag gaa caa gca gag gaa tat gca gct ttg att	962
Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile	
305 310 315	
atg gaa gag tta gat cct gaa aga ctt ggc tac ata gag cta tgg caa	1010
Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln	
320 325 330	
cta gag act ttg ctt cta caa aaa gac aca tac ctc aat tac agt caa	1058
Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln	
335 340 345	
gca ttg agc tat acg agc caa gca ttg agc caa aac ctt caa ggg tta	1106
Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu	
350 355 360	
agg gga aag agt cga ata cat aga atg agt tcg gat ttc gtc tac att	1154
Arg Gly Lys Ser Arg Ile His Arg Met Ser Ser Asp Phe Val Tyr Ile	
365 370 375 380	
atg caa gag aat tgg aaa agg ata tgg gtt tta tcc tta tgg atc atg	1202
Met Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Ser Leu Trp Ile Met	
385 390 395	
atc atg atc gga tta ttc ttg tgg aaa ttc ttc caa tac aag caa aaa	1250
Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys Phe Phe Gln Tyr Lys Gln Lys	
400 405 410	
gat gca ttt cat gtg atg gga tat tgt tta ctc aca gcc aaa gga gca	1298
Asp Ala Phe His Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala	
415 420 425	

gct gaa aca ctt aaa ttc aac atg gct cta ata ctt ttc cca gtt tgc	1346
Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Phe Pro Val Cys	
430 435 440	
aga aac acc att act tgg ctt aga tcc aca aga ctc tct tac ttc gtt	1394
Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Val	
445 450 455 460	
cct ttt gat gat aat atc aac ttc cac aag aca att gct gga gcc att	1442
Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Ile Ala Gly Ala Ile	
465 470 475	
gta gta gct gtg atc ctt cat att gga gac cat ctt gct tgt gat ttc	1490
Val Val Ala Val Ile Leu His Ile Gly Asp His Leu Ala Cys Asp Phe	
480 485 490	
cct aga att gtt aga gcc acc gaa tac gat tac aat cgg tat ctg ttt	1538
Pro Arg Ile Val Arg Ala Thr Glu Tyr Asp Tyr Asn Arg Tyr Leu Phe	
495 500 505	
cat tac ttt caa aca aaa cag cca aca tac ttc gac ctc gtt aag gga	1586
His Tyr Phe Gln Thr Lys Gln Pro Thr Tyr Phe Asp Leu Val Lys Gly	
510 515 520	
cct gaa gga atc act ggg att tta atg gtc att ttg atg att att tca	1634
Pro Glu Gly Ile Thr Gly Ile Leu Met Val Ile Leu Met Ile Ile Ser	
525 530 535 540	
ttc aca tta gca aca aga tgg ttt agg cgt aac cta gtc aag ctt cct	1682
Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Asn Leu Val Lys Leu Pro	
545 550 555	
aag cca ttt gat cga cta acc ggt ttt aac gcc ttt tgg tat tcg cat	1730
Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His	
560 565 570	
cat ttg ttc gtc att gtt tat atc ttg ctt att ctt cat ggt atc ttc	1778
His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ile Leu Leu Ile Leu His Gly Ile Phe	
575 580 585	
ctc tat ttc gcc aag cct tgg tat gtt cgt acg aca tgg atg tat ctt	1826
Leu Tyr Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Val Arg Thr Thr Trp Met Tyr Leu	
590 595 600	
gca gta cca gtt tta ctc tat ggt gga gaa aga aca ctt agg tac ttc	1874
Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Phe	
605 610 615 620	
cgt tct ggt tct tat tcg gtt cga ctg ctt aag gtt gct ata tat cct	1922
Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro	
625 630 635	
ggt aat gtt cta acg cta caa atg tcg aaa cca act caa ttt cgt tac	1970
Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro Thr Gln Phe Arg Tyr	
640 645 650	
aaa agc gga caa tac atg ttt gtc caa tgt cct gcg gtt tcg cca ttc	2018
Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe	
655 660 665	
gag tgg cat cca ttc tca att act tcc gca cct gaa gat gat tat atc	2066
Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Glu Asp Asp Tyr Ile	
670 675 680	
agc att cac att aga caa ctt ggt gat tgg act caa gaa ctc aaa aga	2114
Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg	
685 690 695 700	

gta ttc tct gaa gtt tgt gag cca ccg gtt ggc ggt aaa agc gga ctt	2162
Val Phe Ser Glu Val Cys Glu Pro Pro Val Gly Gly Lys Ser Gly Leu	
705 710 715	
ctc aga gcc gac gaa aca aca aag aaa agt ttg cca aag cta ttg ata	2210
Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile	
720 725 730	
gat gga ccg tac ggt gca cca gca caa gat tat agg aaa tat gat gtt	2258
Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val	
735 740 745	
ctc tta tta gtt ggt ctt ggc att ggt gca act cca ttt atc agt atc	2306
Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile	
750 755 760	
ttg aaa gat ttg ctt aac aac att gtt aaa atg gaa gag cat gcg gat	2354
Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Val Lys Met Glu Glu His Ala Asp	
765 770 775 780	
tcg atc tcg gat ttc agt aga tca tca gaa tac agc aca gga agc aac	2402
Ser Ile Ser Asp Phe Ser Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Asn	
785 790 795	
ggt gac acg cca aga cga aag aga ata cta aaa acc aca aat gct tat	2450
Gly Asp Thr Pro Arg Arg Lys Arg Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr	
800 805 810	
ttc tac tgg gtc aca aga gaa caa ggc tct ttt gat tgg ttc aaa ggt	2498
Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly	
815 820 825	
gtc atg aac gaa gtt gca gaa ctt gac caa cgg ggt gtg ata gag atg	2546
Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met	
830 835 840	
cat aac tat tta aca agt gtg tat gaa gaa ggt gat gct cgt tct gct	2594
His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala	
845 850 855 860	
ctc att aca atg gtt caa gct ctt aat cat gcc aaa aat ggt gtc gac	2642
Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp	
865 870 875	
att gtc tct ggc act agg gtc aga aca cac ttt gca aga cct aat tgg	2690
Ile Val Ser Gly Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp	
880 885 890	
aag aag gtt ctc aca aag cta agt tcc aag cat tgc aat gca aga aca	2738
Lys Lys Val Leu Thr Lys Leu Ser Ser Lys His Cys Asn Ala Arg Thr	
895 900 905	
gga gtg ttt tat tgc gga gta ccg gtt tta ggg aag gag ctt agc aaa	2786
Gly Val Phe Tyr Cys Gly Val Pro Val Leu Gly Lys Glu Leu Ser Lys	
910 915 920	
cta tgc aac aca ttc aat caa aaa ggt tca acc aag ttt gaa ttt cac	2834
Leu Cys Asn Thr Phe Asn Gln Lys Gly Ser Thr Lys Phe Glu Phe His	
925 930 935 940	
aag gag cat ttc taaaagacaa gaaggaagaa gccaaaagcc ctctagattc	2886
Lys Glu His Phe	
tttaatatct caaatttagc cacttatagt ataaaggcaa tctcttcaact atttaattca	2946
aagtgattaa acgttaacac actgtcaaaa gtgagtgtgt taacgttttag ctccacacgt	3006
tctagggttta tatacaccga ggcatacgtg taaatatacg agacagaaga aattcaaggg	3066

ggtttgatag aagc

<210> 12

<211> 944

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Met	Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Trp	Ser	Phe	Asp	Ser	1	5	10	15
Val	Ser	Ala	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Ser	Thr	Ser	Pro	Gly	20	25	30	
Thr	Glu	Tyr	Ser	Ile	Asn	Gly	Asp	Gln	Glu	Phe	Val	Glu	Val	Thr	Ile	35	40	45	
Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	50	55	60	
Thr	Ala	Ile	Asn	Val	Ile	Gly	Asp	Ile	Ser	Asp	Asp	Asn	Thr	Gly	Ile	65	70	75	80
Met	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Thr	Met	Lys	Arg	Thr	Ser	85	90	95	
Ser	Asn	Arg	Phe	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	100	105	110	
Ala	Lys	Ala	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	115	120	125	
Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Asn	Gln	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	145	150	155	160
Ala	Leu	Arg	Lys	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	165	170	175	
Gln	Arg	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Ile	Ser	Asn	Lys	Gln	Lys	Asn	180	185	190	
Val	Asp	Gly	Trp	Asn	Asp	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Glu	Lys	Phe	Glu	Lys	195	200	205	
Asn	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Met	Lys	210	215	220	
Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	225	230	235	240
Arg	Arg	Leu	Lys	Val	Glu	Lys	Ile	Asn	His	Asp	Glu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	245	250	255	
Trp	Ser	Gln	Ile	Asn	Asp	Glu	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Phe	260	265	270	
Phe	Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Arg	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu	275	280	285	
Val	Lys	Glu	Ile	Ile	Met	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Arg	290	295	300	
Leu	Lys	Glu	Gln	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	305	310	315	320
Asp	Pro	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ile	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	325	330	335	

Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Tyr	340	345	350	
Thr	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Lys	Ser	355	360	365	
Arg	Ile	His	Arg	Met	Ser	Ser	Asp	Phe	Val	Tyr	Ile	Met	Gln	Glu	Asn	370	375	380	
Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	Val	Leu	Ser	Leu	Trp	Ile	Met	Ile	Met	Ile	Gly	385	390	395	400
Leu	Phe	Leu	Trp	Lys	Phe	Phe	Gln	Tyr	Lys	Gln	Lys	Asp	Ala	Phe	His	405	410	415	
Val	Met	Gly	Tyr	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	420	425	430	
Lys	Phe	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Phe	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	435	440	445	
Thr	Trp	Leu	Arg	Ser	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Phe	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	450	455	460	
Asn	Ile	Asn	Phe	His	Lys	Thr	Ile	Ala	Gly	Ala	Ile	Val	Val	Ala	Val	465	470	475	480
Ile	Leu	His	Ile	Gly	Asp	His	Leu	Ala	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Ile	Val	485	490	495	
Arg	Ala	Thr	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Leu	Phe	His	Tyr	Phe	Gln	500	505	510	
Thr	Lys	Gln	Pro	Thr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Pro	Glu	Gly	Ile	515	520	525	
Thr	Gly	Ile	Leu	Met	Val	Ile	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Phe	Thr	Leu	Ala	530	535	540	
Thr	Arg	Trp	Phe	Arg	Arg	Asn	Leu	Val	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	Asp	545	550	555	560
Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	His	Leu	Phe	Val	565	570	575	
Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ile	Phe	Leu	Tyr	Phe	Ala	580	585	590	
Lys	Pro	Trp	Tyr	Val	Arg	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Val	595	600	605	
Leu	Leu	Tyr	Gly	Gly	Glu	Arg	Thr	Leu	Arg	Tyr	Phe	Arg	Ser	Gly	Ser	610	615	620	
Tyr	Ser	Val	Arg	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	625	630	635	640
Thr	Leu	Gln	Met	Ser	Lys	Pro	Thr	Gln	Phe	Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	645	650	655	
Tyr	Met	Phe	Val	Gln	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	660	665	670	
Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ile	Ser	Ile	His	Ile	675	680	685	
Arg	Gln	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Gln	Glu	Leu	Lys	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	690	695	700	
Val	Cys	Glu	Pro	Pro	Val	Gly	Gly	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	705	710	715	720

Glu	Thr	Thr	Lys	Lys	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr
			725						730					735	
Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Val
			740					745					750		
Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu
		755					760					765			
Leu	Asn	Asn	Ile	Val	Lys	Met	Glu	Glu	His	Ala	Asp	Ser	Ile	Ser	Asp
	770					775					780				
Phe	Ser	Arg	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Thr	Gly	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Pro
785					790					795					800
Arg	Arg	Lys	Arg	Ile	Leu	Lys	Thr	Thr	Asn	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val
			805						810					815	
Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Asn	Glu
		820						825					830		
Val	Ala	Glu	Leu	Asp	Gln	Arg	Gly	Val	Ile	Glu	Met	His	Asn	Tyr	Leu
	835						840					845			
Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Met
	850					855					860				
Val	Gln	Ala	Leu	Asn	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Ser	Gly
865				870						875					880
Thr	Arg	Val	Arg	Thr	His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Lys	Lys	Val	Leu
			885						890					895	
Thr	Lys	Leu	Ser	Ser	Lys	His	Cys	Asn	Ala	Arg	Thr	Gly	Val	Phe	Tyr
		900						905					910		
Cys	Gly	Val	Pro	Val	Leu	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Cys	Asn	Thr
	915						920					925			
Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Ser	Thr	Lys	Phe	Glu	Phe	His	Lys	Glu	His	Phe
	930					935					940				

<210> 13

<211> 3035

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (132)..(2894)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 13

```

tcaaacacct tttgagagcg gttatTTTTT ctctatcaac taatacagta accttacggg 60
tgTTTTatttg tatagatctc tgtggTTTTt ttggccaact ctagtgagat ctttttCGTT 120
tctcgaattc g atg aaa atg aga cga ggc aat tca agt aac gac cat gaa 170
          Met Lys Met Arg Arg Gly Asn Ser Ser Asn Asp His Glu
            1             5             10

ctt ggg att cta cga gga gct aac tcg gac acc aac tcg gac acg gag 218
Leu Gly Ile Leu Arg Gly Ala Asn Ser Asp Thr Asn Ser Asp Thr Glu
  15             20             25

agc atc gct agc gac cgt ggt gcc ttt agc ggt ccg ctt ggc cgg cct 266
Ser Ile Ala Ser Asp Arg Gly Ala Phe Ser Gly Pro Leu Gly Arg Pro
  30             35             40             45

```

aaa	cgt	gcg	tcc	aag	aaa	aac	gca	aga	ttc	gcc	gac	gat	ctt	ccc	aag	314
Lys	Arg	Ala	Ser	Lys	Lys	Asn	Ala	Arg	Phe	Ala	Asp	Asp	Leu	Pro	Lys	
				50					55					60		
aga	agc	aat	agt	gtt	gct	ggc	ggc	cgt	ggt	gat	gac	gat	gag	tac	gtg	362
Arg	Ser	Asn	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Arg	Gly	Asp	Asp	Asp	Glu	Tyr	Val	
			65					70					75			
gag	atc	acg	cta	gac	atc	agg	gac	gac	tcg	gtg	gcc	gtc	cat	agt	gtc	410
Glu	Ile	Thr	Leu	Asp	Ile	Arg	Asp	Asp	Ser	Val	Ala	Val	His	Ser	Val	
		80					85					90				
caa	caa	gca	gct	gga	ggt	gga	ggc	cac	ctg	gag	gac	ccg	gag	cta	gcc	458
Gln	Gln	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	His	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	
	95					100					105					
ctt	ctt	acg	aag	aag	act	ctc	gag	agc	agc	ctc	aac	aac	acc	acc	tcc	506
Leu	Leu	Thr	Lys	Lys	Thr	Leu	Glu	Ser	Ser	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Ser	
110					115					120					125	
tta	tct	ttc	ttc	cga	agc	acc	tcc	tca	cgc	atc	aag	aac	gcc	tcc	cgc	554
Leu	Ser	Phe	Phe	Arg	Ser	Thr	Ser	Ser	Arg	Ile	Lys	Asn	Ala	Ser	Arg	
				130					135					140		
gag	ctc	cgc	cgc	gtg	ttc	tct	aga	cgt	ccc	tcc	ccg	gcc	gtg	cgg	cgg	602
Glu	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Pro	Ala	Val	Arg	Arg	
			145					150					155			
ttt	gac	cgc	acg	agc	tcc	gcg	gcc	atc	cac	gca	ctc	aaa	ggt	ctc	aag	650
Phe	Asp	Arg	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala	Ile	His	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	Lys	
		160					165					170				
ttc	att	gcc	acc	aag	acg	gcc	gca	tgg	ccg	gcc	gtc	gac	caa	cgt	ttc	698
Phe	Ile	Ala	Thr	Lys	Thr	Ala	Ala	Trp	Pro	Ala	Val	Asp	Gln	Arg	Phe	
	175					180					185					
gat	aaa	ctc	tcc	gct	gat	tcc	aac	ggc	ctc	tta	ctc	tct	gcc	aag	ttt	746
Asp	Lys	Leu	Ser	Ala	Asp	Ser	Asn	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Lys	Phe	
190					195					200					205	
tgg	gaa	tgc	tta	gga	atg	aat	aag	gaa	tct	aaa	gac	ttc	gct	gac	cag	794
Trp	Glu	Cys	Leu	Gly	Met	Asn	Lys	Glu	Ser	Lys	Asp	Phe	Ala	Asp	Gln	
				210					215					220		
ctc	ttt	aga	gca	tta	gct	cgc	cgg	aat	aac	gtc	tcc	ggc	gat	gca	atc	842
Leu	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Asn	Asn	Val	Ser	Gly	Asp	Ala	Ile	
			225					230					235			
aca	aag	gaa	cag	ctt	agg	ata	ttc	tgg	gaa	cag	atc	tca	gac	gaa	agc	890
Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Ile	Phe	Trp	Glu	Gln	Ile	Ser	Asp	Glu	Ser	
		240					245					250				
ttt	gat	gcc	aaa	ctc	caa	gtc	ttt	ttt	gac	atg	gtg	gac	aaa	gat	gaa	938
Phe	Asp	Ala	Lys	Leu	Gln	Val	Phe	Phe	Asp	Met	Val	Asp	Lys	Asp	Glu	
	255					260					265					
gat	ggg	cga	gta	aca	gaa	gaa	gag	gtg	gct	gag	att	att	agt	ctt	agt	986
Asp	Gly	Arg	Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ser	
270					275					280					285	
gct	tct	gca	aac	aag	ctc	tca	aat	att	caa	aag	caa	gcc	aaa	gaa	tat	1034
Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	Asn	Ile	Gln	Lys	Gln	Ala	Lys	Glu	Tyr	
				290					295					300		
gcg	gca	ctg	ata	atg	gaa	gag	ttg	gac	cca	gac	aat	gct	ggg	ttt	att	1082
Ala	Ala	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Asp	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	
			305					310					315			

atg atc gaa aac ttg gaa atg ttg cta tta caa gca ccg aac cag tcg	1130
Met Ile Glu Asn Leu Glu Met Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asn Gln Ser	
320 325 330	
gtg cgg atg gga gac agc agg ata ctt agt cag atg tta agt cag aag	1178
Val Arg Met Gly Asp Ser Arg Ile Leu Ser Gln Met Leu Ser Gln Lys	
335 340 345	
ctt aga ccg gca aaa gag agc aac cct tta ttg aga tgg tcg gag aaa	1226
Leu Arg Pro Ala Lys Glu Ser Asn Pro Leu Leu Arg Trp Ser Glu Lys	
350 355 360 365	
atc aaa tat ttc ata ctt gat aat tgg cag aga tta tgg atc atg atg	1274
Ile Lys Tyr Phe Ile Leu Asp Asn Trp Gln Arg Leu Trp Ile Met Met	
370 375 380	
tta tgg ctt ggc atc tgt ggt ggc ctc ttt act tat aaa ttc att cag	1322
Leu Trp Leu Gly Ile Cys Gly Gly Leu Phe Thr Tyr Lys Phe Ile Gln	
385 390 395	
tac aag aac aaa gct gcc tat ggt gtg atg ggt tat tgt gtt tgt gtc	1370
Tyr Lys Asn Lys Ala Ala Tyr Gly Val Met Gly Tyr Cys Val Cys Val	
400 405 410	
gcc aaa gga ggc gcc gag act ctc aaa ttc aac atg gct ctc ata ttg	1418
Ala Lys Gly Gly Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu	
415 420 425	
ttg cct gtt tgt cga aac acc atc act tgg ctt agg aac aag acc aag	1466
Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Lys	
430 435 440 445	
ctt ggt act gtc gtt cct ttt gat gat agt ctt aac ttc cac aag gtt	1514
Leu Gly Thr Val Val Pro Phe Asp Asp Ser Leu Asn Phe His Lys Val	
450 455 460	
att gca agc ggg ata gtc gtc ggt gtt ttg ctc cat gcg ggt gcc cat	1562
Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Gly Val Leu Leu His Ala Gly Ala His	
465 470 475	
tta acg tgt gat ttt cca cgt tta att gcc gcg gat gag gac acc tat	1610
Leu Thr Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Ala Ala Asp Glu Asp Thr Tyr	
480 485 490	
gag ccg atg gaa aaa tac ttt ggg gat caa ccg act agc tac tgg tgg	1658
Glu Pro Met Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Gln Pro Thr Ser Tyr Trp Trp	
495 500 505	
ttt gtg aaa gga gtg gaa gga tgg act ggc att gtg atg gtt gtg cta	1706
Phe Val Lys Gly Val Glu Gly Trp Thr Gly Ile Val Met Val Val Leu	
510 515 520 525	
atg gct ata gcc ttt aca ctc gct acg cct tgg ttc cga cgt aac aag	1754
Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Asn Lys	
530 535 540	
ctt aac tta cct aac ttc ctc aag aag ctt acc ggt ttc aac gcc ttt	1802
Leu Asn Leu Pro Asn Phe Leu Lys Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe	
545 550 555	
tgg tac acc cac cat ttg ttc atc att gtt tat gct ctt ctc att gtc	1850
Trp Tyr Thr His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ala Leu Leu Ile Val	
560 565 570	
cat ggt atc aag ctc tac ctc aca aag att tgg tat cag aag acg aca	1898
His Gly Ile Lys Leu Tyr Leu Thr Lys Ile Trp Tyr Gln Lys Thr Thr	
575 580 585	

tgg	atg	tat	ctt	gct	gta	ccc	atc	ctt	cta	tat	gca	tct	gag	agg	ctg	1946
Trp	Met	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Glu	Arg	Leu	
590					595					600					605	
ctc	cgt	gct	ttc	aga	tca	agc	atc	aaa	ccg	gtt	aag	atg	atc	aag	gtg	1994
Leu	Arg	Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Lys	Pro	Val	Lys	Met	Ile	Lys	Val	
				610					615					620		
gct	gtt	tac	ccc	ggg	aac	gtg	ttg	tct	cta	cac	atg	acg	aag	cca	caa	2042
Ala	Val	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	His	Met	Thr	Lys	Pro	Gln	
			625					630					635			
gga	ttc	aaa	tac	aaa	agt	gga	cag	ttc	atg	ttg	gtg	aac	tgc	cga	gcc	2090
Gly	Phe	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Phe	Met	Leu	Val	Asn	Cys	Arg	Ala	
	640						645					650				
gta	tct	cca	ttc	gaa	tgg	cat	cct	ttc	tca	atc	aca	tca	gct	ccc	gga	2138
Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	
	655					660					665					
gac	gat	tac	ctg	agc	gta	cat	atc	cgc	act	ctc	ggt	gac	tgg	aca	cgt	2186
Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Arg	
	670				675					680					685	
aag	ctc	agg	acc	gtt	ttc	tcc	gag	gtt	tgc	aaa	cct	cct	acc	gcc	ggt	2234
Lys	Leu	Arg	Thr	Val	Phe	Ser	Glu	Val	Cys	Lys	Pro	Pro	Thr	Ala	Gly	
				690					695					700		
aaa	agc	ggt	ctt	ctc	cga	gca	gac	gga	gga	gat	gga	aac	ctc	ccg	ttc	2282
Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Leu	Pro	Phe	
			705					710					715			
ccg	aag	gtc	ctt	atc	gac	ggt	cca	tac	ggt	gct	ccc	gca	caa	gac	tac	2330
Pro	Lys	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	
		720					725					730				
aag	aaa	tac	gac	gtg	gta	ctc	ctc	gta	ggt	ctc	ggc	att	gga	gcc	acg	2378
Lys	Lys	Tyr	Asp	Val	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	
	735					740					745					
cct	atg	atc	agt	atc	ctt	aag	gac	atc	atc	aac	aac	atg	aaa	ggt	cct	2426
Pro	Met	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asn	Asn	Met	Lys	Gly	Pro	
	750				755					760					765	
gac	cgc	gac	agc	gac	att	gag	aac	aat	aac	agt	aac	aac	aat	agt	aaa	2474
Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Lys	
				770					775					780		
ggg	ttt	aag	aca	agg	aaa	gct	tat	ttc	tac	tgg	gtg	act	agg	gaa	caa	2522
Gly	Phe	Lys	Thr	Arg	Lys	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	
			785					790					795			
gga	tca	ttc	gag	tgg	ttc	aag	gga	ata	atg	gac	gag	att	tcg	gag	tta	2570
Gly	Ser	Phe	Glu	Trp	Phe	Lys	Gly	Ile	Met	Asp	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	
		800					805					810				
gac	gag	gaa	gga	atc	atc	gag	ctt	cac	aat	tat	tgc	acg	agt	gtg	tac	2618
Asp	Glu	Glu	Gly	Ile	Ile	Glu	Leu	His	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ser	Val	Tyr	
	815					820					825					
gag	gaa	ggt	gat	gca	aga	gtg	gct	ctc	att	gcc	atg	ctt	cag	tcg	ttg	2666
Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Ile	Ala	Met	Leu	Gln	Ser	Leu	
	830				835					840					845	
caa	cac	gct	aag	aac	ggt	gtg	gat	gtt	gtg	tcg	ggt	aca	cgt	gtc	aag	2714
Gln	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Val	Val	Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Lys	
				850					855					860		

```

tcc cac ttc gct aaa cct aac tgg aga caa gtc tac aag aag atc gct 2762
Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg Gln Val Tyr Lys Lys Ile Ala
      865                      870                      875

gtt caa cat ccc ggc aaa aga ata gga gtc ttc tac tgt gga atg cca 2810
Val Gln His Pro Gly Lys Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Met Pro
      880                      885                      890

gga atg ata aag gaa tta aaa aat cta gct ttg gat ttt tct cga aag 2858
Gly Met Ile Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ala Leu Asp Phe Ser Arg Lys
      895                      900                      905

aca act acc aag ttt gac ttc cac aaa gag aac ttc tagattaatt 2904
Thr Thr Thr Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe
      910                      915                      920

atatacgttg tagaaaaata aaacaagaaa caactatata aataaatatt tatttttaa 2964
tctttttcatt ttatgtaaaa ttatctgagt tatctttttt tggttaaaaaa aaaaaaaaaa 3024
aaaaaaaaaaa a 3035

<210> 14
<211> 921
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14
Met Lys Met Arg Arg Gly Asn Ser Ser Asn Asp His Glu Leu Gly Ile
 1          5          10          15
Leu Arg Gly Ala Asn Ser Asp Thr Asn Ser Asp Thr Glu Ser Ile Ala
      20          25          30
Ser Asp Arg Gly Ala Phe Ser Gly Pro Leu Gly Arg Pro Lys Arg Ala
      35          40          45
Ser Lys Lys Asn Ala Arg Phe Ala Asp Asp Leu Pro Lys Arg Ser Asn
      50          55          60
Ser Val Ala Gly Gly Arg Gly Asp Asp Asp Glu Tyr Val Glu Ile Thr
      65          70          75          80
Leu Asp Ile Arg Asp Asp Ser Val Ala Val His Ser Val Gln Gln Ala
      85          90          95
Ala Gly Gly Gly Gly His Leu Glu Asp Pro Glu Leu Ala Leu Leu Thr
      100          105          110
Lys Lys Thr Leu Glu Ser Ser Leu Asn Asn Thr Thr Ser Leu Ser Phe
      115          120          125
Phe Arg Ser Thr Ser Ser Arg Ile Lys Asn Ala Ser Arg Glu Leu Arg
      130          135          140
Arg Val Phe Ser Arg Arg Pro Ser Pro Ala Val Arg Arg Phe Asp Arg
      145          150          155          160
Thr Ser Ser Ala Ala Ile His Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Ala
      165          170          175
Thr Lys Thr Ala Ala Trp Pro Ala Val Asp Gln Arg Phe Asp Lys Leu
      180          185          190
Ser Ala Asp Ser Asn Gly Leu Leu Leu Ser Ala Lys Phe Trp Glu Cys
      195          200          205
Leu Gly Met Asn Lys Glu Ser Lys Asp Phe Ala Asp Gln Leu Phe Arg
      210          215          220

```

Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Asn	Asn	Val	Ser	Gly	Asp	Ala	Ile	Thr	Lys	Glu
225					230					235					240
Gln	Leu	Arg	Ile	Phe	Trp	Glu	Gln	Ile	Ser	Asp	Glu	Ser	Phe	Asp	Ala
				245					250					255	
Lys	Leu	Gln	Val	Phe	Phe	Asp	Met	Val	Asp	Lys	Asp	Glu	Asp	Gly	Arg
			260					265					270		
Val	Thr	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala
		275					280					285			
Asn	Lys	Leu	Ser	Asn	Ile	Gln	Lys	Gln	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu
	290					295					300				
Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Asp	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	Met	Ile	Glu
305					310					315					320
Asn	Leu	Glu	Met	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Ser	Val	Arg	Met
				325					330					335	
Gly	Asp	Ser	Arg	Ile	Leu	Ser	Gln	Met	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	Pro
			340					345					350		
Ala	Lys	Glu	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu	Arg	Trp	Ser	Glu	Lys	Ile	Lys	Tyr
		355					360					365			
Phe	Ile	Leu	Asp	Asn	Trp	Gln	Arg	Leu	Trp	Ile	Met	Met	Leu	Trp	Leu
	370					375					380				
Gly	Ile	Cys	Gly	Gly	Leu	Phe	Thr	Tyr	Lys	Phe	Ile	Gln	Tyr	Lys	Asn
385					390					395					400
Lys	Ala	Ala	Tyr	Gly	Val	Met	Gly	Tyr	Cys	Val	Cys	Val	Ala	Lys	Gly
				405					410					415	
Gly	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Phe	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val
		420						425					430		
Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Lys	Leu	Gly	Thr
		435					440					445			
Val	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Ser
	450					455					460				
Gly	Ile	Val	Val	Gly	Val	Leu	Leu	His	Ala	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Cys
465					470					475					480
Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Asp	Thr	Tyr	Glu	Pro	Met
				485					490					495	
Glu	Lys	Tyr	Phe	Gly	Asp	Gln	Pro	Thr	Ser	Tyr	Trp	Trp	Phe	Val	Lys
			500					505					510		
Gly	Val	Glu	Gly	Trp	Thr	Gly	Ile	Val	Met	Val	Val	Leu	Met	Ala	Ile
		515					520					525			
Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Trp	Phe	Arg	Arg	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu
	530					535					540				
Pro	Asn	Phe	Leu	Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Thr
545					550					555					560
His	His	Leu	Phe	Ile	Ile	Val	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ile	Val	His	Gly	Ile
				565					570					575	
Lys	Leu	Tyr	Leu	Thr	Lys	Ile	Trp	Tyr	Gln	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr
			580					585					590		
Leu	Ala	Val	Pro	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ser	Glu	Arg	Leu	Leu	Arg	Ala
		595					600					605			

Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Lys	Pro	Val	Lys	Met	Ile	Lys	Val	Ala	Val	Tyr
610						615					620				
Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	His	Met	Thr	Lys	Pro	Gln	Gly	Phe	Lys
625					630					635					640
Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Phe	Met	Leu	Val	Asn	Cys	Arg	Ala	Val	Ser	Pro
				645					650					655	
Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr
			660					665					670		
Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Arg	Lys	Leu	Arg
		675					680					685			
Thr	Val	Phe	Ser	Glu	Val	Cys	Lys	Pro	Pro	Thr	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly
	690					695					700				
Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Leu	Pro	Phe	Pro	Lys	Val
705					710					715					720
Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Lys	Tyr
				725					730					735	
Asp	Val	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Pro	Met	Ile
			740					745					750		
Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Ile	Asn	Asn	Met	Lys	Gly	Pro	Asp	Arg	Asp
		755					760					765			
Ser	Asp	Ile	Glu	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Lys	Gly	Phe	Lys
	770					775					780				
Thr	Arg	Lys	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe
785					790					795					800
Glu	Trp	Phe	Lys	Gly	Ile	Met	Asp	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Asp	Glu	Glu
				805					810					815	
Gly	Ile	Ile	Glu	Leu	His	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly
			820					825					830		
Asp	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Ile	Ala	Met	Leu	Gln	Ser	Leu	Gln	His	Ala
		835					840					845			
Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Val	Val	Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Lys	Ser	His	Phe
	850					855					860				
Ala	Lys	Pro	Asn	Trp	Arg	Gln	Val	Tyr	Lys	Lys	Ile	Ala	Val	Gln	His
865					870					875					880
Pro	Gly	Lys	Arg	Ile	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Met	Pro	Gly	Met	Ile
				885					890					895	
Lys	Glu	Leu	Lys	Asn	Leu	Ala	Leu	Asp	Phe	Ser	Arg	Lys	Thr	Thr	Thr
			900					905					910		
Lys	Phe	Asp	Phe	His	Lys	Glu	Asn	Phe							
		915					920								

<210> 15

<211> 3338

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (313)..(3129)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 15

```

ggcacgagaa aatccccaat cttttatttg tttattaaaa ttagtacgcc aagaaagaaa 60
gaaagaaaga cagaaagact cgggtcttctt tcttctcttg gtctgaaact ccaaaataga 120
ataccaatta ttaatctttt gtcattctttt tccttctcgc gttcatatat actggaatat 180
acatcttttt ttcaacctat cttcttttcat tttcaagaat tcggggttcca taaatagtag 240
gttcactact tttatttcaa cctccttaaa gtttattcat tcatattttt tctcaaagaa 300
aaaactatag aa atg caa aat tcg gaa aat cat cat ccg cac cac cag cac 351
          Met Gln Asn Ser Glu Asn His His Pro His His Gln His
              1              5              10

cac cat tcg gac aca gag ata att gga aat gat aga gcg tcg tac agt 399
His His Ser Asp Thr Glu Ile Ile Gly Asn Asp Arg Ala Ser Tyr Ser
      15              20              25

ggg ccg tta agc gga ccg tta aac aaa cga ggc ggc aaa aag agt gcg 447
Gly Pro Leu Ser Gly Pro Leu Asn Lys Arg Gly Gly Lys Lys Ser Ala
      30              35              40              45

aga ttt aac att cct gaa tct acc gac atc gga acc agt gtc gga acc 495
Arg Phe Asn Ile Pro Glu Ser Thr Asp Ile Gly Thr Ser Val Gly Thr
              50              55              60

ggc ggc aag tcc aat gat gat gcg tac gtt gaa atc act ctc gat gtc 543
Gly Gly Lys Ser Asn Asp Asp Ala Tyr Val Glu Ile Thr Leu Asp Val
              65              70              75

cgc gaa gat tcc gtc gct gtc cac agt gtc aaa act gcc ggc ggt gat 591
Arg Glu Asp Ser Val Ala Val His Ser Val Lys Thr Ala Gly Gly Asp
              80              85              90

gac gtg gaa gat ccc gag ctg gct tta ttg gct aaa ggc tta gag aag 639
Asp Val Glu Asp Pro Glu Leu Ala Leu Leu Ala Lys Gly Leu Glu Lys
              95              100              105

aag tcc act tta gga tct tca ctt gtt cga aat gct tcg tct aga att 687
Lys Ser Thr Leu Gly Ser Ser Leu Val Arg Asn Ala Ser Ser Arg Ile
      110              115              120              125

cgg caa gtg tca caa gag ctc agg cgt ttg gct tcc tta aat aaa cgc 735
Arg Gln Val Ser Gln Glu Leu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Asn Lys Arg
              130              135              140

cca att cct act gga agg ttc gac agg aat aaa tca gct gct gct cat 783
Pro Ile Pro Thr Gly Arg Phe Asp Arg Asn Lys Ser Ala Ala Ala His
              145              150              155

gct ctt aaa ggt ctc aag ttt att agt aag acc gac ggc ggc gct ggt 831
Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly
              160              165              170

tgg gcc gcc gtc gag aag cgg ttc gat gag att act gct tct act act 879
Trp Ala Ala Val Glu Lys Arg Phe Asp Glu Ile Thr Ala Ser Thr Thr
      175              180              185

ggg ttg ctt cct cgt gcc aaa ttt gga gaa tgt ata ggt atg aat aag 927
Gly Leu Leu Pro Arg Ala Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Asn Lys
      190              195              200              205

gag tct aag gaa ttt gct gtt gag cta tat gat gcg cta gct cgg agg 975
Glu Ser Lys Glu Phe Ala Val Glu Leu Tyr Asp Ala Leu Ala Arg Arg
              210              215              220

aga aac att aca act gat tcc att aac aaa gca cag ctc aaa gag ttc 1023
Arg Asn Ile Thr Thr Asp Ser Ile Asn Lys Ala Gln Leu Lys Glu Phe
              225              230              235

```

tgg	gac	caa	gtg	gct	gac	caa	agt	ttt	gat	tct	cgc	ctt	caa	aca	ttt	1071
Trp	Asp	Gln	Val	Ala	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	
		240					245					250				
ttt	gac	atg	gtt	gat	aaa	gat	gct	gat	ggg	aga	att	aca	gaa	gaa	gaa	1119
Phe	Asp	Met	Val	Asp	Lys	Asp	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu	
	255					260					265					
gtc	aga	gag	att	ata	ggc	ctt	agc	gcg	tcg	gcc	aac	agg	ctg	tca	aca	1167
Val	Arg	Glu	Ile	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	
270					275					280					285	
atc	cag	aaa	caa	gct	gat	gaa	tac	gca	gca	atg	atc	atg	gaa	gag	ttg	1215
Ile	Gln	Lys	Gln	Ala	Asp	Glu	Tyr	Ala	Ala	Met	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	
			290						295					300		
gat	cct	aac	aac	ctc	gga	tac	att	atg	att	gag	aac	ttg	gaa	atg	ctt	1263
Asp	Pro	Asn	Asn	Leu	Gly	Tyr	Ile	Met	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Met	Leu	
		305					310					315				
tta	ctg	caa	gca	cca	aat	caa	tca	gtg	caa	aga	gga	ggc	gaa	agt	cgg	1311
Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Asn	Gln	Ser	Val	Gln	Arg	Gly	Gly	Glu	Ser	Arg	
	320					325					330					
aac	ttg	agt	caa	atg	cta	agt	caa	aaa	cta	aag	cat	aca	caa	gag	aga	1359
Asn	Leu	Ser	Gln	Met	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Lys	His	Thr	Gln	Glu	Arg	
	335					340					345					
aat	cca	ata	gta	aga	tgg	tac	aag	agt	ttc	atg	tac	ttt	ttg	ctg	gat	1407
Asn	Pro	Ile	Val	Arg	Trp	Tyr	Lys	Ser	Phe	Met	Tyr	Phe	Leu	Leu	Asp	
350					355				360						365	
aat	tgg	caa	aga	gtt	tgg	gta	ttg	tta	ctg	tgg	att	gga	att	atg	gct	1455
Asn	Trp	Gln	Arg	Val	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Gly	Ile	Met	Ala	
			370						375					380		
ggg	cta	ttt	aca	tgg	aaa	tat	ata	cag	tat	aaa	gaa	aaa	gct	gca	tat	1503
Gly	Leu	Phe	Thr	Trp	Lys	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Tyr	
		385						390				395				
aaa	gtc	atg	ggg	ccc	tgt	gtg	tgt	ttt	gcc	aaa	ggg	gct	gct	gaa	aca	1551
Lys	Val	Met	Gly	Pro	Cys	Val	Cys	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	
	400					405						410				
ctc	aag	ctc	aac	atg	gca	att	att	tta	ttt	ccg	gtt	tgc	aga	aac	acg	1599
Leu	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Ile	Ile	Leu	Phe	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	
	415					420					425					
atc	aca	tgg	ctt	cga	aat	aag	acc	aga	tta	ggg	gct	gct	gtt	cct	ttt	1647
Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Pro	Phe	
430					435					440					445	
gat	gat	aac	ctt	aat	ttt	cac	aaa	gtg	ata	gca	gtg	gca	att	gct	ctt	1695
Asp	Asp	Asn	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Val	Ala	Ile	Ala	Leu	
				450					455					460		
ggg	gtt	gga	ata	cac	gga	cta	tct	cac	ttg	aca	tgt	gat	ttt	cct	cgg	1743
Gly	Val	Gly	Ile	His	Gly	Leu	Ser	His	Leu	Thr	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	
		465						470					475			
ctt	tta	aat	gct	agt	gaa	gaa	gaa	tat	gaa	cca	atg	aag	tac	tat	ttt	1791
Leu	Leu	Asn	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Tyr	Glu	Pro	Met	Lys	Tyr	Tyr	Phe	
		480					485					490				
gga	gat	cag	cca	gaa	agc	tat	tgg	tgg	ttt	ata	aaa	gga	gta	gaa	ggg	1839
Gly	Asp	Gln	Pro	Glu	Ser	Tyr	Trp	Trp	Phe	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Gly	
	495					500					505					

gta act gga att ata atg gtg gtt tta atg gca ata gca ttt act cta	1887
Val Thr Gly Ile Ile Met Val Val Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu	
510 515 520 525	
gca acc cca tgg ttt aga agg aat aga gtt agt ttg cca aaa cca ttt	1935
Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Asn Arg Val Ser Leu Pro Lys Pro Phe	
530 535 540	
cac aaa ctc act gga tnt aat gcc ttt tgg tac tct cac cat ctc ttt	1983
His Lys Leu Thr Gly Xaa Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe	
545 550 555	
gtt atc gtc tac act ctg ttc att gtg cat ggt gaa aag cta tac att	2031
Val Ile Val Tyr Thr Leu Phe Ile Val His Gly Glu Lys Leu Tyr Ile	
560 565 570	
acc aaa gat tgg tac aag aga acc gac atg gat gta ctt tta act atc	2079
Thr Lys Asp Trp Tyr Lys Arg Thr Asp Met Asp Val Leu Leu Thr Ile	
575 580 585	
cca atc ata ctc tat gct agt gaa agg ttg att agg gca ttc agg tca	2127
Pro Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Ile Arg Ala Phe Arg Ser	
590 595 600 605	
agc att aaa gct gtt aag att ttg aag gtg gca gta tat cca gga aat	2175
Ser Ile Lys Ala Val Lys Ile Leu Lys Val Ala Val Tyr Pro Gly Asn	
610 615 620	
gtg ttg gca ctt cac atg tca aaa cca cag gcc tac aaa tac aaa agt	2223
Val Leu Ala Leu His Met Ser Lys Pro Gln Gly Tyr Lys Tyr Lys Ser	
625 630 635	
ggg caa tac atg ttt gtc aac tgt gct gca gtt tct cca ttt gag tgg	2271
Gly Gln Tyr Met Phe Val Asn Cys Ala Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp	
640 645 650	
cat cca ttt tca att act tgc gcc cca gga gat gac tat ctc agt gtc	2319
His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Val	
655 660 665	
cat att cga act ctt ggt gat tgg acc agg caa ctt aaa act gtt ttc	2367
His Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Arg Gln Leu Lys Thr Val Phe	
670 675 680 685	
tcc gag gtt tgc cag cca cca cct aat gga aaa agt gga ctc ctc aga	2415
Ser Glu Val Cys Gln Pro Pro Pro Asn Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg	
690 695 700	
gct gac tac ttg caa gga gag aat aat cct aat ttc cca agg gtg tta	2463
Ala Asp Tyr Leu Gln Gly Glu Asn Asn Pro Asn Phe Pro Arg Val Leu	
705 710 715	
ata gat gga cca tat gga gca cca gca caa gac tac aag aaa tat gag	2511
Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Lys Lys Tyr Glu	
720 725 730	
gtg gtt ttg ttg gta ggt ctt gga att gga gct aca cca atg atc agt	2559
Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Met Ile Ser	
735 740 745	
att gtt aaa gac att gtc aac aac atg aag gca atg gac gaa gaa gaa	2607
Ile Val Lys Asp Ile Val Asn Asn Met Lys Ala Met Asp Glu Glu Glu	
750 755 760 765	
aat tcc ttg gaa gat gga cac aat aat aat atg gca cca aat tct agc	2655
Asn Ser Leu Glu Asp Gly His Asn Asn Asn Met Ala Pro Asn Ser Ser	
770 775 780	

```

ccc aat att gca aaa aat aag ggt aat aaa tca ggt tca gca agt gga 2703
Pro Asn Ile Ala Lys Asn Lys Gly Asn Lys Ser Gly Ser Ala Ser Gly
      785                      790                      795

gga aat aat ttc aat aca agg aga gca tat ttc tat tgg gtt act aga 2751
Gly Asn Asn Phe Asn Thr Arg Arg Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg
      800                      805                      810

gaa caa ggt tca ttt gat tgg ttc aaa ggt ata atg aat gaa gct gct 2799
Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ala Ala
      815                      820                      825

gaa atg gac cat aag gga gta att gaa atg cat aat tat tgt act agt 2847
Glu Met Asp His Lys Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Cys Thr Ser
      830                      835                      840                      845

gtt tat gaa gaa ggt gat gct cgt tct gct ctt att act atg ctt cag 2895
Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln
      850                      855                      860

tct ctt cac cat gcc aaa aat ggt gtt gac att gtc tct ggc acc aga 2943
Ser Leu His His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Arg
      865                      870                      875

gtt aag tca cat ttt gct aaa cct aat tgg cgt aat gtc tac aaa cgc 2991
Val Lys Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg Asn Val Tyr Lys Arg
      880                      885                      890

att gct ctc aac cac cct gag gct aaa gtt ggg gtc ttc tat tgt ggg 3039
Ile Ala Leu Asn His Pro Glu Ala Lys Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly
      895                      900                      905

gca cca gca ctg acc aaa gaa cta aga caa cac gcc ttg gat ttt tca 3087
Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg Gln His Ala Leu Asp Phe Ser
      910                      915                      920                      925

cac aag aca tct acc aag ttt gat ttc cat aaa gaa aat ttt 3129
His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe
      930                      935

tgagcaaaga atagaccatt aagcagagca ttaaaatttc atcaaaacag ctaaggacac 3189
aggttggtttt atagaagtct accaactctc cctattgtgt acagataatg ttgcacttca 3249
agttgatata tagttgtggt tgtgatgcta gtatattaca aaataataag attattttta 3309
ttttagtagtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3338

<210> 16
<211> 939
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 16
Met Gln Asn Ser Glu Asn His His Pro His His Gln His His His Ser
  1                      5                      10                      15
Asp Thr Glu Ile Ile Gly Asn Asp Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Pro Leu
      20                      25                      30
Ser Gly Pro Leu Asn Lys Arg Gly Gly Lys Lys Ser Ala Arg Phe Asn
      35                      40                      45
Ile Pro Glu Ser Thr Asp Ile Gly Thr Ser Val Gly Thr Gly Gly Lys
      50                      55                      60
Ser Asn Asp Asp Ala Tyr Val Glu Ile Thr Leu Asp Val Arg Glu Asp
      65                      70                      75                      80

```

Ser	Val	Ala	Val	His	Ser	Val	Lys	Thr	Ala	Gly	Gly	Asp	Asp	Val	Glu
				85					90					95	
Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Lys	Gly	Leu	Glu	Lys	Lys	Ser	Thr
			100					105					110		
Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Arg	Asn	Ala	Ser	Ser	Arg	Ile	Arg	Gln	Val
		115					120					125			
Ser	Gln	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Asn	Lys	Arg	Pro	Ile	Pro
	130					135					140				
Thr	Gly	Arg	Phe	Asp	Arg	Asn	Lys	Ser	Ala	Ala	Ala	His	Ala	Leu	Lys
145					150					155					160
Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Ser	Lys	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Trp	Ala	Ala
			165						170					175	
Val	Glu	Lys	Arg	Phe	Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Gly	Leu	Leu
			180					185					190		
Pro	Arg	Ala	Lys	Phe	Gly	Glu	Cys	Ile	Gly	Met	Asn	Lys	Glu	Ser	Lys
		195					200					205			
Glu	Phe	Ala	Val	Glu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Arg	Asn	Ile
	210					215					220				
Thr	Thr	Asp	Ser	Ile	Asn	Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Glu	Phe	Trp	Asp	Gln
225					230					235					240
Val	Ala	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Phe	Asp	Met
				245					250					255	
Val	Asp	Lys	Asp	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	Thr	Glu	Glu	Glu	Val	Arg	Glu
			260					265					270		
Ile	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Ile	Gln	Lys
		275					280					285			
Gln	Ala	Asp	Glu	Tyr	Ala	Ala	Met	Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Asn
	290					295					300				
Asn	Leu	Gly	Tyr	Ile	Met	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Met	Leu	Leu	Leu	Gln
305					310					315					320
Ala	Pro	Asn	Gln	Ser	Val	Gln	Arg	Gly	Gly	Glu	Ser	Arg	Asn	Leu	Ser
				325					330					335	
Gln	Met	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Lys	His	Thr	Gln	Glu	Arg	Asn	Pro	Ile
			340					345					350		
Val	Arg	Trp	Tyr	Lys	Ser	Phe	Met	Tyr	Phe	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Gln
		355					360					365			
Arg	Val	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Gly	Ile	Met	Ala	Gly	Leu	Phe
	370					375					380				
Thr	Trp	Lys	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Tyr	Lys	Val	Met
385					390					395					400
Gly	Pro	Cys	Val	Cys	Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu
				405					410					415	
Asn	Met	Ala	Ile	Ile	Leu	Phe	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp
			420					425					430		
Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn
		435					440					445			
Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Val	Ala	Ile	Ala	Leu	Gly	Val	Gly
	450					455					460				

Ile	His	Gly	Leu	Ser	His	Leu	Thr	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	465	470	475	480
Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Tyr	Glu	Pro	Met	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Asp	Gln	485	490	495	
Pro	Glu	Ser	Tyr	Trp	Trp	Phe	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	500	505	510	
Ile	Ile	Met	Val	Val	Leu	Met	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	515	520	525	
Trp	Phe	Arg	Arg	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Pro	Lys	Pro	Phe	His	Lys	Leu	530	535	540	
Thr	Gly	Xaa	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	His	Leu	Phe	Val	Ile	Val	545	550	555	560
Tyr	Thr	Leu	Phe	Ile	Val	His	Gly	Glu	Lys	Leu	Tyr	Ile	Thr	Lys	Asp	565	570	575	
Trp	Tyr	Lys	Arg	Thr	Asp	Met	Asp	Val	Leu	Leu	Thr	Ile	Pro	Ile	Ile	580	585	590	
Leu	Tyr	Ala	Ser	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg	Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Lys	595	600	605	
Ala	Val	Lys	Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	610	615	620	
Leu	His	Met	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	625	630	635	640
Met	Phe	Val	Asn	Cys	Ala	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	645	650	655	
Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	660	665	670	
Thr	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Arg	Gln	Leu	Lys	Thr	Val	Phe	Ser	Glu	Val	675	680	685	
Cys	Gln	Pro	Pro	Pro	Asn	Gly	Lys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Tyr	690	695	700	
Leu	Gln	Gly	Glu	Asn	Asn	Pro	Asn	Phe	Pro	Arg	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	705	710	715	720
Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Glu	Val	Val	Leu	725	730	735	
Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Pro	Met	Ile	Ser	Ile	Val	Lys	740	745	750	
Asp	Ile	Val	Asn	Asn	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Ser	Leu	755	760	765	
Glu	Asp	Gly	His	Asn	Asn	Asn	Met	Ala	Pro	Asn	Ser	Ser	Pro	Asn	Ile	770	775	780	
Ala	Lys	Asn	Lys	Gly	Asn	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	785	790	795	800
Phe	Asn	Thr	Arg	Arg	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	805	810	815	
Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Gly	Ile	Met	Asn	Glu	Ala	Ala	Glu	Met	Asp	820	825	830	
His	Lys	Gly	Val	Ile	Glu	Met	His	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	835	840	845	

Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Met	Leu	Gln	Ser	Leu	His
850						855					860				
His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Lys	Ser
865					870					875					880
His	Phe	Ala	Lys	Pro	Asn	Trp	Arg	Asn	Val	Tyr	Lys	Arg	Ile	Ala	Leu
				885					890					895	
Asn	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Val	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Ala	Pro	Ala
			900					905					910		
Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Arg	Gln	His	Ala	Leu	Asp	Phe	Ser	His	Lys	Thr
		915					920					925			
Ser	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe	His	Lys	Glu	Asn	Phe					
930						935									

<210> 17

<211> 2532

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2529)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 17

atg	gcg	tcg	ccg	tac	gac	cac	cag	tcg	ccg	cat	gcg	cag	cac	ccg	tcg	48
Met	Ala	Ser	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	Ser	Pro	His	Ala	Gln	His	Pro	Ser	
1				5				10						15		
ggg	ttg	ccg	agg	ccg	ccg	ggg	gcg	ggg	gcg	ggt	gcg	gcg	gcg	ggc	ggg	96
Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	
			20					25						30		
ttc	gcg	cgg	ggg	ctg	atg	aag	cag	ccg	tcg	cgg	ctg	gcg	tcc	ggg	gtg	144
Phe	Ala	Arg	Gly	Leu	Met	Lys	Gln	Pro	Ser	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	
			35				40					45				
agg	cag	ttc	gcg	tcg	agg	gtg	tcg	atg	aag	gtg	ccg	gag	ggg	gtg	ggg	192
Arg	Gln	Phe	Ala	Ser	Arg	Val	Ser	Met	Lys	Val	Pro	Glu	Gly	Val	Gly	
			50				55				60					
ggg	atg	cgg	ccc	ggt	ggc	ggg	agg	atg	acg	cgg	atg	cag	tcc	agc	gcg	240
Gly	Met	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Thr	Arg	Met	Gln	Ser	Ser	Ala	
	65				70				75						80	
cag	gtg	ggg	ctc	cgg	ggg	ctc	cgc	ttc	ctc	gac	aag	acg	tcc	ggc	ggg	288
Gln	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys	Thr	Ser	Gly	Gly	
			85						90					95		
aag	gag	ggg	tgg	aag	tcc	gtc	gag	cgc	cgc	ttc	gac	gag	atg	aac	cgc	336
Lys	Glu	Gly	Trp	Lys	Ser	Val	Glu	Arg	Arg	Phe	Asp	Glu	Met	Asn	Arg	
			100					105					110			
aac	ggc	cgc	ctc	ccc	aag	gag	agc	ttc	ggc	aag	tgc	atc	ggc	atg	ggg	384
Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Phe	Gly	Lys	Cys	Ile	Gly	Met	Gly	
			115				120					125				
gac	tcc	aag	gag	ttc	gcc	ggc	gag	ctg	ttc	gtg	gcg	ctg	gcg	cgg	cgg	432
Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Gly	Glu	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	
			130			135					140					
agg	aac	ctg	gag	ccg	gag	gac	ggc	atc	acc	aag	gag	cag	ctc	aag	gag	480
Arg	Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	
145					150					155					160	

ttc	tgg	gag	gag	atg	acc	gac	cag	aac	ttc	gac	tcg	cgg	ctt	cgc	att	528
Phe	Trp	Glu	Glu	Met	Thr	Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Arg	Ile	
				165					170					175		
ttc	ttt	gac	atg	tgc	gac	aag	aat	ggc	gat	ggg	atg	ctc	acg	gaa	gat	576
Phe	Phe	Asp	Met	Cys	Asp	Lys	Asn	Gly	Asp	Gly	Met	Leu	Thr	Glu	Asp	
			180					185					190			
gag	gtc	aag	gag	gtt	att	ata	ctg	agt	gcg	tcg	gcg	aac	aag	ctg	gcg	624
Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ala	
			195				200					205				
aag	ctg	aag	gga	cac	gcg	gcg	acg	tac	gcg	tcg	ctg	atc	atg	gag	gag	672
Lys	Leu	Lys	Gly	His	Ala	Ala	Thr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Glu	
	210				215						220					
ctg	gac	ccg	gac	gac	cgc	ggg	tac	atc	gag	atc	tgg	cag	ctg	gag	acg	720
Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	Arg	Gly	Tyr	Ile	Glu	Ile	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr	
225					230				235					240		
ctg	ctg	cgc	ggc	atg	gtg	agc	gcg	cag	gcg	gcg	ccg	gag	aag	atg	aag	768
Leu	Leu	Arg	Gly	Met	Val	Ser	Ala	Gln	Ala	Ala	Pro	Glu	Lys	Met	Lys	
				245				250						255		
cgg	acg	acg	tcg	agc	ctc	gcg	agg	acg	atg	atc	ccg	tcg	cgg	tac	cgg	816
Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Met	Ile	Pro	Ser	Arg	Tyr	Arg	
			260					265					270			
agc	ccg	ctg	aag	cgg	cac	gtg	tcc	agg	acg	gtg	gac	ttc	gtg	cac	gag	864
Ser	Pro	Leu	Lys	Arg	His	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	Phe	Val	His	Glu	
			275				280					285				
aac	tgg	aag	cgg	atc	tgg	ctc	gtc	gcg	ctg	tgg	ctc	gcc	gtc	aac	gtc	912
Asn	Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	Leu	Val	Ala	Leu	Trp	Leu	Ala	Val	Asn	Val	
	290					295					300					
ggc	ctc	ttc	gcc	tac	aag	ttc	gag	cag	tac	gag	cgg	cgc	gcc	gcg	ttc	960
Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	Lys	Phe	Glu	Gln	Tyr	Glu	Arg	Arg	Ala	Ala	Phe	
305				310					315					320		
cag	gtg	atg	ggc	cac	tgc	gtg	tgc	gtg	gcc	aag	ggc	gcc	gcc	gag	gtg	1008
Gln	Val	Met	Gly	His	Cys	Val	Cys	Val	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	
				325				330						335		
ctc	aag	ctc	aac	atg	gcg	ctc	atc	ctc	ctc	ccc	gtg	tgc	cgg	aac	acg	1056
Leu	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr	
			340					345					350			
ctc	acc	acg	ctc	agg	tcc	acg	gcg	ctc	agc	cac	gtc	atc	ccc	ttc	gac	1104
Leu	Thr	Thr	Leu	Arg	Ser	Thr	Ala	Leu	Ser	His	Val	Ile	Pro	Phe	Asp	
			355				360					365				
gac	aac	atc	aac	ttc	cac	aag	gtg	atc	gcg	gcg	acc	atc	gcc	gcc	gcc	1152
Asp	Asn	Ile	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Ala	
	370				375						380					
acc	gcc	gtc	cac	acg	ctg	gcg	cac	gtc	acc	tgc	gac	ttc	ccg	agg	ctg	1200
Thr	Ala	Val	His	Thr	Leu	Ala	His	Val	Thr	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	
385					390					395				400		
atc	aac	tgc	ccc	agc	gac	aag	ttc	atg	gcg	acg	ctg	ggg	ccg	aac	ttc	1248
Ile	Asn	Cys	Pro	Ser	Asp	Lys	Phe	Met	Ala	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Phe	
				405				410					415			
ggg	tac	agg	cag	ccg	acg	tac	gcc	gac	ctg	ctg	gag	agc	gcc	ccc	ggc	1296
Gly	Tyr	Arg	Gln	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	
			420					425					430			

gtc	acc	ggc	atc	ctc	atg	atc	atc	atc	atg	tcc	ttc	tcc	ttc	acg	ctg	1344
Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Met	Ile	Ile	Ile	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Thr	Leu	
		435						440								
gcc	acg	cac	tcc	ttc	cgc	cgg	agc	gtc	gtc	aag	ctg	ccg	tgc	ccg	ctg	1392
Ala	Thr	His	Ser	Phe	Arg	Arg	Ser	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	
		450				455					460					
cac	cac	ctc	gcc	ggc	ttc	aac	gcc	ttc	tgg	tac	gcg	cac	cac	ctc	ctg	1440
His	His	Leu	Ala	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	His	His	Leu	Leu	
		465			470					475					480	
gtg	ctc	gcc	tac	gtc	ctc	ctc	gtc	gtg	cac	tcc	tac	ttc	ata	ttc	ctc	1488
Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Leu	Leu	Val	Val	His	Ser	Tyr	Phe	Ile	Phe	Leu	
				485					490					495		
acc	agg	gag	tgg	tac	aag	aaa	acg	aca	tgg	atg	tac	ctg	ata	gtc	cca	1536
Thr	Arg	Glu	Trp	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ile	Val	Pro	
			500					505					510			
gtg	ctc	ttc	tat	gca	tgc	gag	aga	acg	atc	aga	aaa	gtt	cga	gag	aac	1584
Val	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	Arg	Glu	Asn	
		515					520					525				
aac	tac	cgc	gtg	agc	atc	gtc	aag	gca	gcg	att	tac	cca	gga	aat	gtg	1632
Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Ile	Val	Lys	Ala	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	
		530				535					540					
ctc	tct	ctt	cac	atg	aag	aag	ccg	ccg	ggc	ttc	aag	tac	aag	agc	ggg	1680
Leu	Ser	Leu	His	Met	Lys	Lys	Pro	Pro	Gly	Phe	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly	
		545			550					555					560	
atg	tac	ctg	ttt	gtg	aag	tgc	cct	gat	gtc	tct	cct	ttc	gaa	tgg	cat	1728
Met	Tyr	Leu	Phe	Val	Lys	Cys	Pro	Asp	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	
				565					570					575		
ccc	ttc	tcc	atc	act	tct	gca	cct	gga	gat	gac	tac	ctg	agt	gtg	cat	1776
Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His	
			580					585					590			
atc	cgt	aca	cta	ggc	gac	tgg	acg	act	gaa	ctc	aga	aac	ctg	ttt	ggg	1824
Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Thr	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Phe	Gly	
		595				600						605				
aag	gct	tgc	gag	gca	cag	ggt	act	tct	aag	aag	gct	acc	ctt	tca	aga	1872
Lys	Ala	Cys	Glu	Ala	Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg	
		610				615					620					
ctt	gaa	act	aca	ggt	gtg	gcg	gac	gct	cag	aca	gag	gat	act	agg	ttt	1920
Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Gln	Thr	Glu	Asp	Thr	Arg	Phe	
		625			630				635						640	
cct	aag	gtc	ctt	att	gat	ggg	ccc	tat	ggc	gca	ccg	gcg	caa	aac	tac	1968
Pro	Lys	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn	Tyr	
				645					650					655		
aag	aag	tat	gac	att	ctt	ttg	ctt	att	ggc	ctt	gga	att	ggc	gct	act	2016
Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	
			660					665					670			
cct	ttc	atc	agc	att	ctg	aag	gat	ctg	ttg	aac	aac	att	aaa	tcc	aac	2064
Pro	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Asn	Asn	Ile	Lys	Ser	Asn	
		675					680					685				
gaa	gag	gtg	gaa	agc	ata	cat	ggc	tct	gag	ata	ggc	agc	ttc	aag	aac	2112
Glu	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	His	Gly	Ser	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Lys	Asn	
		690				695					700					

aat ggg cca gga aga gct tac ttc tac tgg gtg acc aga gag caa ggg 2160
 Asn Gly Pro Gly Arg Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly
 705 710 715 720
 tcc ttc gag tgg ttt aaa gga gtc atg aac gat gtc gct gaa agt gat 2208
 Ser Phe Glu Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Asp Val Ala Glu Ser Asp
 725 730 735
 cac aat aat att ata gag atg cac aat tac ctg acc agc gtg tat gaa 2256
 His Asn Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu
 740 745 750
 gaa ggc gac gca agg tca gct ttg att gcc atg gtt cag tca ctt caa 2304
 Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Ala Met Val Gln Ser Leu Gln
 755 760 765
 cat gcc aaa aat ggt gtg gat atc gtc tcc ggc agc agg att cgc aca 2352
 His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Ser Arg Ile Arg Thr
 770 775 780
 cat ttt gcg agg cct aac tgg aga aag gtg ttc tct gac ttg gcg aat 2400
 His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Phe Ser Asp Leu Ala Asn
 785 790 795 800
 gcc cac aaa aac tca cgc ata ggt gtt ttc tat tgt gga tcc cct aca 2448
 Ala His Lys Asn Ser Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ser Pro Thr
 805 810 815
 ctc acg aaa caa ctc aag gat ctt tca aaa gaa ttc agc cag aca acc 2496
 Leu Thr Lys Gln Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Phe Ser Gln Thr Thr
 820 825 830
 aca act aga ttc cac ttc cac aag gaa aac ttt taa 2532
 Thr Thr Arg Phe His Phe His Lys Glu Asn Phe
 835 840
 <210> 18
 <211> 843
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 18
 Met Ala Ser Pro Tyr Asp His Gln Ser Pro His Ala Gln His Pro Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Pro Arg Pro Pro Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
 Phe Ala Arg Gly Leu Met Lys Gln Pro Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val
 35 40 45
 Arg Gln Phe Ala Ser Arg Val Ser Met Lys Val Pro Glu Gly Val Gly
 50 55 60
 Gly Met Arg Pro Gly Gly Gly Arg Met Thr Arg Met Gln Ser Ser Ala
 65 70 75 80
 Gln Val Gly Leu Arg Gly Leu Arg Phe Leu Asp Lys Thr Ser Gly Gly
 85 90 95
 Lys Glu Gly Trp Lys Ser Val Glu Arg Arg Phe Asp Glu Met Asn Arg
 100 105 110
 Asn Gly Arg Leu Pro Lys Glu Ser Phe Gly Lys Cys Ile Gly Met Gly
 115 120 125
 Asp Ser Lys Glu Phe Ala Gly Glu Leu Phe Val Ala Leu Ala Arg Arg
 130 135 140

Arg	Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu
145					150					155					160
Phe	Trp	Glu	Glu	Met	Thr	Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Arg	Ile
				165					170					175	
Phe	Phe	Asp	Met	Cys	Asp	Lys	Asn	Gly	Asp	Gly	Met	Leu	Thr	Glu	Asp
			180					185					190		
Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Leu	Ala
		195					200					205			
Lys	Leu	Lys	Gly	His	Ala	Ala	Thr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Glu
	210					215					220				
Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	Arg	Gly	Tyr	Ile	Glu	Ile	Trp	Gln	Leu	Glu	Thr
225					230					235					240
Leu	Leu	Arg	Gly	Met	Val	Ser	Ala	Gln	Ala	Ala	Pro	Glu	Lys	Met	Lys
				245					250					255	
Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Met	Ile	Pro	Ser	Arg	Tyr	Arg
			260					265					270		
Ser	Pro	Leu	Lys	Arg	His	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	Phe	Val	His	Glu
		275						280				285			
Asn	Trp	Lys	Arg	Ile	Trp	Leu	Val	Ala	Leu	Trp	Leu	Ala	Val	Asn	Val
	290					295					300				
Gly	Leu	Phe	Ala	Tyr	Lys	Phe	Glu	Gln	Tyr	Glu	Arg	Arg	Ala	Ala	Phe
305					310					315					320
Gln	Val	Met	Gly	His	Cys	Val	Cys	Val	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Glu	Val
				325					330					335	
Leu	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	Cys	Arg	Asn	Thr
			340					345					350		
Leu	Thr	Thr	Leu	Arg	Ser	Thr	Ala	Leu	Ser	His	Val	Ile	Pro	Phe	Asp
		355					360					365			
Asp	Asn	Ile	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Ala
	370					375					380				
Thr	Ala	Val	His	Thr	Leu	Ala	His	Val	Thr	Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu
385					390					395					400
Ile	Asn	Cys	Pro	Ser	Asp	Lys	Phe	Met	Ala	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Phe
				405					410					415	
Gly	Tyr	Arg	Gln	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly
			420					425					430		
Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Met	Ile	Ile	Ile	Met	Ser	Phe	Ser	Phe	Thr	Leu
		435					440					445			
Ala	Thr	His	Ser	Phe	Arg	Arg	Ser	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu
						455					460				
His	His	Leu	Ala	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	His	His	Leu	Leu
465					470					475					480
Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Leu	Leu	Val	Val	His	Ser	Tyr	Phe	Ile	Phe	Leu
				485					490					495	
Thr	Arg	Glu	Trp	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	Tyr	Leu	Ile	Val	Pro
			500					505					510		
Val	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	Arg	Glu	Asn
		515					520					525			

Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Ile	Val	Lys	Ala	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val
530						535					540				
Leu	Ser	Leu	His	Met	Lys	Lys	Pro	Pro	Gly	Phe	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly
545					550					555					560
Met	Tyr	Leu	Phe	Val	Lys	Cys	Pro	Asp	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His
				565					570					575	
Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His
			580					585					590		
Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Thr	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Phe	Gly
		595					600					605			
Lys	Ala	Cys	Glu	Ala	Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg
	610					615					620				
Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Gln	Thr	Glu	Asp	Thr	Arg	Phe
625					630					635					640
Pro	Lys	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn	Tyr
				645					650					655	
Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr
			660					665					670		
Pro	Phe	Ile	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Asn	Asn	Ile	Lys	Ser	Asn
		675					680					685			
Glu	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	His	Gly	Ser	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Lys	Asn
	690					695					700				
Asn	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly
705					710					715					720
Ser	Phe	Glu	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Asn	Asp	Val	Ala	Glu	Ser	Asp
				725					730					735	
His	Asn	Asn	Ile	Ile	Glu	Met	His	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu
			740					745					750		
Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Met	Val	Gln	Ser	Leu	Gln
		755					760					765			
His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Arg	Thr
	770					775					780				
His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Arg	Lys	Val	Phe	Ser	Asp	Leu	Ala	Asn
785					790					795					800
Ala	His	Lys	Asn	Ser	Arg	Ile	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Ser	Pro	Thr
				805					810					815	
Leu	Thr	Lys	Gln	Leu	Lys	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu	Phe	Ser	Gln	Thr	Thr
			820					825					830		
Thr	Thr	Arg	Phe	His	Phe	His	Lys	Glu	Asn	Phe					
		835					840								

<210> 19

<211> 2604

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2601)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 19

atg tct aga gtg agt ttt gaa gtg tca gga ggc tat cac tct gat gca	48
Met Ser Arg Val Ser Phe Glu Val Ser Gly Gly Tyr His Ser Asp Ala	
1 5 10 15	
gaa gcc gga aac agc gga cca atg agc ggt ggt caa tta cca ccg atc	96
Glu Ala Gly Asn Ser Gly Pro Met Ser Gly Gly Gln Leu Pro Pro Ile	
20 25 30	
tat aaa aaa ccg ggg aac tcc aga ttc act gct gag aac agt cag aga	144
Tyr Lys Lys Pro Gly Asn Ser Arg Phe Thr Ala Glu Asn Ser Gln Arg	
35 40 45	
aca cgt acg gca cca tac gtg gac ctc acg gta gat gta caa gac gat	192
Thr Arg Thr Ala Pro Tyr Val Asp Leu Thr Val Asp Val Gln Asp Asp	
50 55 60	
aca gtc tct gta cat agc ttg aaa atg gaa ggt gga tct agc gtt gaa	240
Thr Val Ser Val His Ser Leu Lys Met Glu Gly Gly Ser Ser Val Glu	
65 70 75 80	
gag agt ccg gag ctt act ttg ctg aaa cga aac cgt ctt gag aag aaa	288
Glu Ser Pro Glu Leu Thr Leu Leu Lys Arg Asn Arg Leu Glu Lys Lys	
85 90 95	
aca acg gtg gtg aaa cgt ttg gcg tct gtt tct cac gag ctt aag cgt	336
Thr Thr Val Val Lys Arg Leu Ala Ser Val Ser His Glu Leu Lys Arg	
100 105 110	
ttg aca tct gtt tct ggt ggt att ggt gga aga aag ccg cct cga ccg	384
Leu Thr Ser Val Ser Gly Gly Ile Gly Gly Arg Lys Pro Pro Arg Pro	
115 120 125	
gct aag tta gac cgg act aaa tcc gcc gcg agt caa gcg ttg aag gga	432
Ala Lys Leu Asp Arg Thr Lys Ser Ala Ala Ser Gln Ala Leu Lys Gly	
130 135 140	
ctt aag ttc att agt aaa acc gac ggt ggc gcc ggt tgg tct gcc gtg	480
Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly Trp Ser Ala Val	
145 150 155 160	
gag aag ccg ttt aat cag att acc gcg act acc ggt gga cta ctt ctt	528
Glu Lys Arg Phe Asn Gln Ile Thr Ala Thr Thr Gly Gly Leu Leu Leu	
165 170 175	
cgg aca aag ttc ggt gaa tgc ata gga atg act tca aag gat ttt gct	576
Arg Thr Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Thr Ser Lys Asp Phe Ala	
180 185 190	
ttg gaa ctg ttt gat gca ttg gct aga aga agg aat ata aca ggg gaa	624
Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ala Arg Arg Arg Asn Ile Thr Gly Glu	
195 200 205	
gtg att gat gga gat caa cta aag gag ttt tgg gaa caa att aat gat	672
Val Ile Asp Gly Asp Gln Leu Lys Glu Phe Trp Glu Gln Ile Asn Asp	
210 215 220	
caa agt ttt gat tct ccg ctt aag aca ttc ttt gac atg gtg gat aaa	720
Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Lys Thr Phe Phe Asp Met Val Asp Lys	
225 230 235 240	
gat gct gat ggt aga ctt aca gaa gac gaa gtt aga gag ttg gag agt	768
Asp Ala Asp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Glu Val Arg Glu Leu Glu Ser	
245 250 255	
ctt gag act ctg ctt ttg caa gcg gca aca cag tct gtg ata aca agt	816
Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Ala Ala Thr Gln Ser Val Ile Thr Ser	
260 265 270	

act	ggg	gag	aga	aag	aat	ctg	agt	cat	atg	atg	agt	cag	agg	ctt	aag	864
Thr	Gly	Glu	Arg	Lys	Asn	Leu	Ser	His	Met	Met	Ser	Gln	Arg	Leu	Lys	
	275						280					285				
cct	acg	ttt	aac	cgc	aac	ccg	ttg	aag	cga	tgg	tac	cgt	ggc	ctt	aga	912
Pro	Thr	Phe	Asn	Arg	Asn	Pro	Leu	Lys	Arg	Trp	Tyr	Arg	Gly	Leu	Arg	
	290					295					300					
ttc	ttc	ttg	tta	gac	aac	tgg	caa	aga	tgt	tgg	gtt	ata	gtg	cta	tgg	960
Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Gln	Arg	Cys	Trp	Val	Ile	Val	Leu	Trp	
305					310					315					320	
ttc	ata	gtt	atg	gct	ata	ctc	ttc	acc	tac	aaa	tat	atc	caa	tac	agg	1008
Phe	Ile	Val	Met	Ala	Ile	Leu	Phe	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Arg	
				325					330					335		
cgt	agc	cct	gtg	tat	cca	gtg	atg	ggc	gat	tgt	gtg	tgc	atg	gct	aaa	1056
Arg	Ser	Pro	Val	Tyr	Pro	Val	Met	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Met	Ala	Lys	
			340					345				350				
ggc	gct	gca	gaa	aca	gtg	aag	ctg	aac	atg	gct	ttg	att	ctc	tta	cct	1104
Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Val	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	
	355						360					365				
gtt	tgt	aga	aac	acc	atc	aca	tgg	ctt	aga	aat	aag	acc	agg	ttg	ggc	1152
Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Arg	Leu	Gly	
	370					375					380					
cgt	gtt	gtc	cca	ttt	gat	gac	aat	ctc	aac	ttc	cac	aag	gtt	ata	gcg	1200
Arg	Val	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	
385					390					395					400	
gtg	ggg	att	ata	gtt	gga	gta	acg	atg	cac	gcc	ggg	gca	cat	tta	gcg	1248
Val	Gly	Ile	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Met	His	Ala	Gly	Ala	His	Leu	Ala	
				405					410					415		
tgt	gat	ttc	ccg	cgg	tta	cta	cat	gca	act	cca	gag	gca	tat	agg	cct	1296
Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Leu	His	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Pro	
			420					425					430			
tta	aga	cag	ttt	ttt	ggg	gat	gag	caa	cca	aag	agc	tac	tgg	cat	ttt	1344
Leu	Arg	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Glu	Gln	Pro	Lys	Ser	Tyr	Trp	His	Phe	
	435					440						445				
gta	aac	tcg	gta	gaa	ggc	ata	acc	gga	ctt	gtg	atg	gtt	ttg	tta	atg	1392
Val	Asn	Ser	Val	Glu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Met	
	450					455					460					
gcg	att	gca	ttc	aca	cta	gcc	acg	cct	tgg	ttc	aga	aga	ggg	aag	cta	1440
Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Trp	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	
465					470					475					480	
aac	tat	ctt	cca	gga	cca	tta	aag	aaa	cta	gct	agc	ttc	aat	gcc	ttc	1488
Asn	Tyr	Leu	Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Phe	Asn	Ala	Phe	
			485						490					495		
tgg	tac	act	cat	cat	ttg	ttt	gtc	ata	gtc	tac	att	ctt	ctt	gtt	gct	1536
Trp	Tyr	Thr	His	His	Leu	Phe	Val	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	
			500					505					510			
cat	gga	tac	tac	ttg	tat	ctc	acc	aga	gac	tgg	cac	aat	aaa	acg	act	1584
His	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asp	Trp	His	Asn	Lys	Thr	Thr	
		515					520					525				
tgg	atg	tat	ttg	gtg	gta	cca	gtg	gtt	cta	tac	gcg	tgt	gaa	agg	ttg	1632
Trp	Met	Tyr	Leu	Val	Val	Pro	Val	Val	Leu	Tyr	Ala	Cys	Glu	Arg	Leu	
	530					535					540					

ata	aga	gca	ttc	agg	tcg	agc	atc	aag	gcg	gtg	act	att	agg	aaa	gta	1680
Ile	Arg	Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	
545					550					555					560	
gca	gtt	tat	cca	gga	aac	gtg	ctg	gca	att	cac	ttg	tca	agg	cct	caa	1728
Ala	Val	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	Ile	His	Leu	Ser	Arg	Pro	Gln	
				565					570					575		
aac	ttc	aaa	tac	aag	agt	ggc	caa	tac	atg	ttt	gtt	aac	tgt	gct	gct	1776
Asn	Phe	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Asn	Cys	Ala	Ala	
			580					585					590			
gtt	tct	cca	ttt	gaa	tgg	cat	cca	ttt	tca	atc	aca	tct	gca	cca	caa	1824
Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gln	
		595					600					605				
gat	gat	tac	cta	agt	gtt	cac	att	aga	gtt	ctt	ggg	gat	tgg	aca	cga	1872
Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Val	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Arg	
	610					615					620					
gct	ctc	aaa	gga	gtc	ttc	tct	gag	gtg	tgt	aag	cca	cca	ccg	gca	gga	1920
Ala	Leu	Lys	Gly	Val	Phe	Ser	Glu	Val	Cys	Lys	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	
	625				630					635					640	
gtt	agt	ggc	ctg	ctt	aga	gcc	gac	atg	ttg	cat	ggc	gca	aat	aat	ccc	1968
Val	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	Asp	Met	Leu	His	Gly	Ala	Asn	Asn	Pro	
			645						650					655		
gac	ttc	ccg	aaa	gtc	ttg	att	gat	ggc	cca	tat	ggc	gca	cca	gca	caa	2016
Asp	Phe	Pro	Lys	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	
			660					665					670			
gac	tac	aag	aag	tac	gag	gtg	gtt	cta	cta	gtt	ggc	ctc	ggg	att	gga	2064
Asp	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	
		675					680					685				
gcc	aca	cca	atg	atc	agt	atc	gtc	aaa	gac	att	gtt	aat	aac	atc	aag	2112
Ala	Thr	Pro	Met	Ile	Ser	Ile	Val	Lys	Asp	Ile	Val	Asn	Asn	Ile	Lys	
	690					695					700					
gcc	aag	gaa	caa	gcc	caa	cta	aac	cga	atg	gag	aat	gga	aca	agc	gaa	2160
Ala	Lys	Glu	Gln	Ala	Gln	Leu	Asn	Arg	Met	Glu	Asn	Gly	Thr	Ser	Glu	
	705				710					715					720	
cca	caa	cga	agt	aag	aaa	gag	agt	ttc	agg	acc	cgt	aga	gct	tac	ttc	2208
Pro	Gln	Arg	Ser	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Arg	Thr	Arg	Arg	Ala	Tyr	Phe	
			725						730					735		
tat	tgg	gtt	acg	cgt	gag	caa	ggc	tct	ttc	gat	tgg	ttc	aag	aac	ata	2256
Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	Lys	Asn	Ile	
			740					745					750			
atg	aac	gaa	gtc	gcg	gaa	cga	gat	gcc	aac	cgc	gtc	atc	gaa	atg	cat	2304
Met	Asn	Glu	Val	Ala	Glu	Arg	Asp	Ala	Asn	Arg	Val	Ile	Glu	Met	His	
		755					760					765				
aac	tat	tgt	aca	agt	gtc	tat	gaa	gaa	ggc	gac	gct	cgt	tcc	gca	ctt	2352
Asn	Tyr	Cys	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	
	770					775					780					
ata	cat	atg	ctt	caa	tca	cta	aac	cat	gca	aag	aac	ggc	gtc	gac	att	2400
Ile	His	Met	Leu	Gln	Ser	Leu	Asn	His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	
	785				790					795					800	
gtc	tct	gga	aca	aga	gtt	atg	tcc	cat	ttc	gct	aaa	cct	aat	tgg	aga	2448
Val	Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Met	Ser	His	Phe	Ala	Lys	Pro	Asn	Trp	Arg	
			805						810						815	

aat gtt tac aag cgt ata gct atg gat cat cct aac acc aaa gtt gga 2496
 Asn Val Tyr Lys Arg Ile Ala Met Asp His Pro Asn Thr Lys Val Gly
 820 825 830

gtg ttt tac tgt gga gca cca gca ttg aca aag gag cta agg cat cta 2544
 Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg His Leu
 835 840 845

gct tta gat ttc acc cac aaa aca agc acc aga ttc tcc ttc cac aaa 2592
 Ala Leu Asp Phe Thr His Lys Thr Ser Thr Arg Phe Ser Phe His Lys
 850 855 860

gag aat ttc taa 2604
 Glu Asn Phe
 865

<210> 20
 <211> 867
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20
 Met Ser Arg Val Ser Phe Glu Val Ser Gly Gly Tyr His Ser Asp Ala
 1 5 10 15
 Glu Ala Gly Asn Ser Gly Pro Met Ser Gly Gly Gln Leu Pro Pro Ile
 20 25 30
 Tyr Lys Lys Pro Gly Asn Ser Arg Phe Thr Ala Glu Asn Ser Gln Arg
 35 40 45
 Thr Arg Thr Ala Pro Tyr Val Asp Leu Thr Val Asp Val Gln Asp Asp
 50 55 60
 Thr Val Ser Val His Ser Leu Lys Met Glu Gly Gly Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Glu Leu Thr Leu Leu Lys Arg Asn Arg Leu Glu Lys Lys
 85 90 95
 Thr Thr Val Val Lys Arg Leu Ala Ser Val Ser His Glu Leu Lys Arg
 100 105 110
 Leu Thr Ser Val Ser Gly Gly Ile Gly Gly Arg Lys Pro Pro Arg Pro
 115 120 125
 Ala Lys Leu Asp Arg Thr Lys Ser Ala Ala Ser Gln Ala Leu Lys Gly
 130 135 140
 Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly Trp Ser Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Lys Arg Phe Asn Gln Ile Thr Ala Thr Thr Gly Gly Leu Leu Leu
 165 170 175
 Arg Thr Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Thr Ser Lys Asp Phe Ala
 180 185 190
 Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ala Arg Arg Arg Asn Ile Thr Gly Glu
 195 200 205
 Val Ile Asp Gly Asp Gln Leu Lys Glu Phe Trp Glu Gln Ile Asn Asp
 210 215 220
 Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Lys Thr Phe Phe Asp Met Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Asp Ala Asp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Glu Val Arg Glu Leu Glu Ser
 245 250 255

Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Ala	Thr	Gln	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	260	265	270	
Thr	Gly	Glu	Arg	Lys	Asn	Leu	Ser	His	Met	Met	Ser	Gln	Arg	Leu	Lys	275	280	285
Pro	Thr	Phe	Asn	Arg	Asn	Pro	Leu	Lys	Arg	Trp	Tyr	Arg	Gly	Leu	Arg	290	295	300
Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Gln	Arg	Cys	Trp	Val	Ile	Val	Leu	Trp	305	310	315
Phe	Ile	Val	Met	Ala	Ile	Leu	Phe	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Arg	325	330	335
Arg	Ser	Pro	Val	Tyr	Pro	Val	Met	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Met	Ala	Lys	340	345	350
Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Val	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Pro	355	360	365
Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Arg	Leu	Gly	370	375	380
Arg	Val	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Asn	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	385	390	395
Val	Gly	Ile	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Met	His	Ala	Gly	Ala	His	Leu	Ala	405	410	415
Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Leu	His	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala	Tyr	Arg	Pro	420	425	430
Leu	Arg	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Glu	Gln	Pro	Lys	Ser	Tyr	Trp	His	Phe	435	440	445
Val	Asn	Ser	Val	Glu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Met	450	455	460
Ala	Ile	Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Trp	Phe	Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	465	470	475
Asn	Tyr	Leu	Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Phe	Asn	Ala	Phe	485	490	495
Trp	Tyr	Thr	His	His	Leu	Phe	Val	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	500	505	510
His	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asp	Trp	His	Asn	Lys	Thr	Thr	515	520	525
Trp	Met	Tyr	Leu	Val	Val	Pro	Val	Val	Leu	Tyr	Ala	Cys	Glu	Arg	Leu	530	535	540
Ile	Arg	Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	545	550	555
Ala	Val	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	Ile	His	Leu	Ser	Arg	Pro	Gln	565	570	575
Asn	Phe	Lys	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Asn	Cys	Ala	Ala	580	585	590
Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gln	595	600	605
Asp	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Val	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Arg	610	615	620
Ala	Leu	Lys	Gly	Val	Phe	Ser	Glu	Val	Cys	Lys	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	625	630	635

Val Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Met Leu His Gly Ala Asn Pro
 645 650 655
 Asp Phe Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln
 660 665 670
 Asp Tyr Lys Lys Tyr Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly
 675 680 685
 Ala Thr Pro Met Ile Ser Ile Val Lys Asp Ile Val Asn Asn Ile Lys
 690 695 700
 Ala Lys Glu Gln Ala Gln Leu Asn Arg Met Glu Asn Gly Thr Ser Glu
 705 710 715 720
 Pro Gln Arg Ser Lys Lys Glu Ser Phe Arg Thr Arg Arg Ala Tyr Phe
 725 730 735
 Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ile
 740 745 750
 Met Asn Glu Val Ala Glu Arg Asp Ala Asn Arg Val Ile Glu Met His
 755 760 765
 Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu
 770 775 780
 Ile His Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile
 785 790 795 800
 Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg
 805 810 815
 Asn Val Tyr Lys Arg Ile Ala Met Asp His Pro Asn Thr Lys Val Gly
 820 825 830
 Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg His Leu
 835 840 845
 Ala Leu Asp Phe Thr His Lys Thr Ser Thr Arg Phe Ser Phe His Lys
 850 855 860
 Glu Asn Phe
 865

<210> 21

<211> 2709

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2706)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 21

atg atg aat cga agt gaa atg caa aag tta ggt ttc gaa cac gtg aga 48
 Met Met Asn Arg Ser Glu Met Gln Lys Leu Gly Phe Glu His Val Arg
 1 5 10 15

tac tac aca gag tcg ccg tac aac aga gga gag tcc tcg gcg aac gtg 96
 Tyr Tyr Thr Glu Ser Pro Tyr Asn Arg Gly Glu Ser Ser Ala Asn Val
 20 25 30

gcg acg aca agc aac tat tac ggt gaa gat gaa cca tac gtg gag atc 144
 Ala Thr Thr Ser Asn Tyr Tyr Gly Glu Asp Glu Pro Tyr Val Glu Ile
 35 40 45

acg	cta	gat	atc	cac	gac	gat	tcc	gtc	tcc	gtg	tac	ggc	ttg	aag	tca	192
Thr	Leu	Asp	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Gly	Leu	Lys	Ser	
50						55				60						
ccg	aac	cat	cga	ggg	gcc	ggg	tct	aat	tat	gag	gat	caa	tcg	ctt	ctc	240
Pro	Asn	His	Arg	Gly	Ala	Gly	Ser	Asn	Tyr	Glu	Asp	Gln	Ser	Leu	Leu	
65				70					75					80		
aga	caa	ggt	cgt	tca	ggg	agg	agt	aac	tcg	gta	ttg	aaa	cgc	ttg	gct	288
Arg	Gln	Gly	Arg	Ser	Gly	Arg	Ser	Asn	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Leu	Ala	
			85					90						95		
tct	tct	gtt	tcc	acc	gga	ata	aca	cga	gtt	gct	tct	tct	gtt	tct	tcg	336
Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Gly	Ile	Thr	Arg	Val	Ala	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	
			100					105						110		
tct	tcc	gcg	aga	aaa	cca	ccg	cgg	ccg	cag	ctg	gct	aag	ctg	cgc	cgt	384
Ser	Ser	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Arg	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu	Arg	Arg	
		115					120					125				
tcg	aaa	tct	aga	gca	gag	cta	gct	ctc	aaa	ggt	ctt	aaa	ttc	atc	acc	432
Ser	Lys	Ser	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	Lys	Phe	Ile	Thr	
	130					135					140					
aag	act	gat	ggt	gtc	act	ggt	tgg	cct	gaa	gtt	gag	aaa	cgg	ttt	tat	480
Lys	Thr	Asp	Gly	Val	Thr	Gly	Trp	Pro	Glu	Val	Glu	Lys	Arg	Phe	Tyr	
145				150						155					160	
gtg	atg	aca	atg	act	aat	aac	gga	tta	tta	cac	cga	tcc	aga	ttc	ggt	528
Val	Met	Thr	Met	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	His	Arg	Ser	Arg	Phe	Gly	
			165					170						175		
gaa	tgt	ata	ggg	atg	aaa	tcg	acg	gag	ttt	gcg	ttg	gca	ttg	ttc	gat	576
Glu	Cys	Ile	Gly	Met	Lys	Ser	Thr	Glu	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Asp	
		180						185					190			
gct	tta	gcg	agg	agg	gaa	aac	gta	agc	gga	gat	tca	ata	aac	atg	aat	624
Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Glu	Asn	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Ile	Asn	Met	Asn	
		195					200					205				
gag	ctt	aaa	gag	ttc	tgg	aag	cag	atc	act	gat	caa	gat	ttt	gat	tca	672
Glu	Leu	Lys	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Ile	Thr	Asp	Gln	Asp	Phe	Asp	Ser	
	210					215					220					
agg	cta	cga	act	ttc	ttc	gcc	atg	gtc	gat	aag	gat	tcg	gat	ggg	cgg	720
Arg	Leu	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Met	Val	Asp	Lys	Asp	Ser	Asp	Gly	Arg	
225				230						235				240		
ttg	aat	gaa	gcc	gaa	gta	aga	gag	att	ata	act	tta	agt	gct	tct	gca	768
Leu	Asn	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Glu	Ile	Ile	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	
			245					250						255		
aac	gag	ttg	gat	aac	att	cgg	aga	caa	gct	gat	gaa	tat	gct	gct	ttg	816
Asn	Glu	Leu	Asp	Asn	Ile	Arg	Arg	Gln	Ala	Asp	Glu	Tyr	Ala	Ala	Leu	
		260						265					270			
att	atg	gaa	gaa	ctc	gat	cct	tat	cat	tat	gga	tac	atc	atg	ata	gag	864
Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Tyr	His	Tyr	Gly	Tyr	Ile	Met	Ile	Glu	
		275					280					285				
aat	ctc	gag	ata	ctt	cta	ttg	caa	gcg	ccg	atg	cag	gat	gtg	aga	gat	912
Asn	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Met	Gln	Asp	Val	Arg	Asp	
	290					295					300					
gga	gag	agt	aag	aag	cta	agc	aag	atg	cta	agt	cag	aat	ctc	atg	gtt	960
Gly	Glu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Met	Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Met	Val	
305				310						315					320	

ccg	cag	agt	agg	aat	ctc	ggg	gca	cgt	ttt	tgc	aga	ggg	atg	aag	tat	1008
Pro	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Ala	Arg	Phe	Cys	Arg	Gly	Met	Lys	Tyr	
				325					330					335		
ttt	ttg	ttt	gat	aat	tgg	aag	aga	gtg	tgg	gtg	atg	gct	cta	tgg	ata	1056
Phe	Leu	Phe	Asp	Asn	Trp	Lys	Arg	Val	Trp	Val	Met	Ala	Leu	Trp	Ile	
			340					345					350			
ggg	gct	atg	gcg	ggg	ttg	ttc	acg	tgg	aag	ttt	atg	gag	tat	cga	aaa	1104
Gly	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	Phe	Thr	Trp	Lys	Phe	Met	Glu	Tyr	Arg	Lys	
		355					360					365				
aga	tcc	gct	tac	gaa	gtc	atg	gga	gtt	tgt	gtt	tgt	ata	gct	aaa	gga	1152
Arg	Ser	Ala	Tyr	Glu	Val	Met	Gly	Val	Cys	Val	Cys	Ile	Ala	Lys	Gly	
	370					375					380					
gct	gca	gag	acg	ctt	aaa	cta	aac	atg	gct	atg	att	ttg	tta	cca	gtt	1200
Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Met	Ile	Leu	Leu	Pro	Val	
385					390					395					400	
tgt	agg	aac	acc	atc	act	tgg	ctg	cgg	acc	aaa	acc	aag	tta	agt	gct	1248
Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Thr	Lys	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	
			405						410					415		
att	gtt	cct	ttc	gat	gac	agc	ctc	aat	ttt	cac	aag	gtc	ata	gct	ata	1296
Ile	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Ile	
			420					425					430			
gga	att	tca	gtt	gga	gtt	gga	atc	cat	gct	aca	tct	cac	tta	gca	tgt	1344
Gly	Ile	Ser	Val	Gly	Val	Gly	Ile	His	Ala	Thr	Ser	His	Leu	Ala	Cys	
		435					440					445				
gat	ttc	ccc	cga	ctg	ata	gct	gca	gac	gaa	gat	cag	tat	gag	cca	atg	1392
Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Asp	Gln	Tyr	Glu	Pro	Met	
	450					455					460					
gag	aag	tat	ttt	ggg	cca	cag	aca	aag	aga	tat	ttg	gac	ttt	gtt	caa	1440
Glu	Lys	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gln	Thr	Lys	Arg	Tyr	Leu	Asp	Phe	Val	Gln	
465					470					475					480	
tcg	gta	gaa	gga	gtt	acc	ggg	att	gga	atg	gtt	gta	cta	atg	acc	ata	1488
Ser	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Val	Val	Leu	Met	Thr	Ile	
				485					490					495		
gcc	ttt	aca	ttg	gct	aca	aca	tgg	ttc	aga	cgt	aat	aag	ctc	aac	ctt	1536
Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Thr	Trp	Phe	Arg	Arg	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu	
			500					505					510			
cct	gga	cca	ctg	aag	aaa	ata	aca	ggc	ttc	aat	gcc	ttc	tgg	tac	tct	1584
Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	
		515					520					525				
cac	cac	tta	ttt	gtt	atc	gtc	tac	tcg	ctt	ctt	gtc	gtt	cat	gga	ttc	1632
His	His	Leu	Phe	Val	Ile	Val	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Val	His	Gly	Phe	
	530					535					540					
tac	gta	tac	ctc	atc	atc	gag	cca	tgg	tac	aag	aaa	acg	aca	tgg	atg	1680
Tyr	Val	Tyr	Leu	Ile	Ile	Glu	Pro	Trp	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Trp	Met	
545					550					555					560	
tat	ttg	atg	gta	ccg	gtg	gtt	ctt	tac	ttg	tgt	gaa	agg	ctg	att	cgt	1728
Tyr	Leu	Met	Val	Pro	Val	Val	Leu	Tyr	Leu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg	
				565					570					575		
gca	ttc	agg	tca	agc	gtc	gag	gct	gtt	tca	gtg	cta	aag	gtt	gct	gtg	1776
Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Leu	Lys	Val	Ala	Val	
			580					585					590			

tta	cca	ggg	aat	gtc	ttg	tcg	ctt	cac	ttg	tca	aga	cca	agc	aac	ttc	1824
Leu	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	His	Leu	Ser	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	
		595					600					605				
aga	tac	aag	agt	gga	caa	tac	atg	tat	ctc	aac	tgt	tct	gca	gtt	tct	1872
Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Tyr	Leu	Asn	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	
	610					615					620					
aca	tta	gaa	tgg	cat	cca	ttc	tca	att	acc	tca	gct	cca	gga	gat	gac	1920
Thr	Leu	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp	
	625				630					635					640	
tac	ctc	agt	gtc	cac	atc	agg	gtt	tta	gga	gac	tgg	act	aag	caa	tta	1968
Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Val	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Lys	Gln	Leu	
				645					650					655		
aga	tca	tta	ttc	tct	gag	gtg	tgc	aag	cca	cgc	cct	cct	gat	gaa	cac	2016
Arg	Ser	Leu	Phe	Ser	Glu	Val	Cys	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Asp	Glu	His	
			660					665					670			
aga	ctg	aac	aga	gcc	gac	tcg	aag	cac	tgg	gat	tac	atc	cct	gac	ttt	2064
Arg	Leu	Asn	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	His	Trp	Asp	Tyr	Ile	Pro	Asp	Phe	
		675					680					685				
cca	aga	atc	cta	att	gat	ggt	cca	tat	gga	gca	cca	gca	caa	gac	tac	2112
Pro	Arg	Ile	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Tyr	
		690				695					700					
aag	aag	ttt	gaa	gtt	gtt	ctg	cta	gtg	ggt	cta	gga	atc	ggt	gcc	act	2160
Lys	Lys	Phe	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	
	705				710				715						720	
ccg	atg	atc	agc	ata	gtg	agt	gac	ata	atc	aat	aac	ttg	aaa	ggc	gtg	2208
Pro	Met	Ile	Ser	Ile	Val	Ser	Asp	Ile	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Gly	Val	
				725				730						735		
gaa	gaa	ggc	agt	aac	cga	aga	cag	tca	ccg	atc	cat	aat	atg	gtc	aca	2256
Glu	Glu	Gly	Ser	Asn	Arg	Arg	Gln	Ser	Pro	Ile	His	Asn	Met	Val	Thr	
			740				745						750			
cct	cct	gtt	tct	cca	tca	aga	aaa	agt	gag	acg	ttc	aga	acc	aag	aga	2304
Pro	Pro	Val	Ser	Pro	Ser	Arg	Lys	Ser	Glu	Thr	Phe	Arg	Thr	Lys	Arg	
		755					760					765				
gct	tac	ttc	tac	tgg	gtc	aca	aga	gag	cag	ggg	tcg	ttt	gac	tgg	ttc	2352
Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Ser	Phe	Asp	Trp	Phe	
	770					775					780					
aag	aac	gtg	atg	gac	gaa	gtg	act	gaa	aca	gac	cgc	aaa	aac	gta	att	2400
Lys	Asn	Val	Met	Asp	Glu	Val	Thr	Glu	Thr	Asp	Arg	Lys	Asn	Val	Ile	
	785				790					795					800	
gag	ctg	cat	aat	tac	tgc	acc	agc	gtt	tac	gag	gaa	ggg	gac	gcg	agg	2448
Glu	Leu	His	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	
				805					810					815		
tct	gca	ctt	atc	acg	atg	ctc	cag	tct	cta	aac	cat	gct	aag	cat	gga	2496
Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Met	Leu	Gln	Ser	Leu	Asn	His	Ala	Lys	His	Gly	
			820				825						830			
gtg	gac	gtt	gtg	tca	gga	aca	cgt	gtc	atg	tcc	cat	ttc	gct	agg	cca	2544
Val	Asp	Val	Val	Ser	Gly	Thr	Arg	Val	Met	Ser	His	Phe	Ala	Arg	Pro	
		835					840					845				
aac	tgg	aga	agc	gtt	ttc	aaa	agg	atc	gct	gtg	aat	cat	cct	aag	act	2592
Asn	Trp	Arg	Ser	Val	Phe	Lys	Arg	Ile	Ala	Val	Asn	His	Pro	Lys	Thr	
	850					855					860					

aga gtc gga gtg ttt tat tgt gga gca gct ggg tta gtg aaa gag tta 2640
 Arg Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Lys Glu Leu
 865 870 875 880

cga cac tta tca ctg gat ttc tct cat aag acc tcc acc aag ttc atc 2688
 Arg His Leu Ser Leu Asp Phe Ser His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Ile
 885 890 895

ttc cat aaa gag aat ttc taa 2709
 Phe His Lys Glu Asn Phe
 900

<210> 22

<211> 902

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

Met Met Asn Arg Ser Glu Met Gln Lys Leu Gly Phe Glu His Val Arg
 1 5 10 15

Tyr Tyr Thr Glu Ser Pro Tyr Asn Arg Gly Glu Ser Ser Ala Asn Val
 20 25 30

Ala Thr Thr Ser Asn Tyr Tyr Gly Glu Asp Glu Pro Tyr Val Glu Ile
 35 40 45

Thr Leu Asp Ile His Asp Asp Ser Val Ser Val Tyr Gly Leu Lys Ser
 50 55 60

Pro Asn His Arg Gly Ala Gly Ser Asn Tyr Glu Asp Gln Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Arg Gln Gly Arg Ser Gly Arg Ser Asn Ser Val Leu Lys Arg Leu Ala
 85 90 95

Ser Ser Val Ser Thr Gly Ile Thr Arg Val Ala Ser Ser Val Ser Ser
 100 105 110

Ser Ser Ala Arg Lys Pro Pro Arg Pro Gln Leu Ala Lys Leu Arg Arg
 115 120 125

Ser Lys Ser Arg Ala Glu Leu Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Thr
 130 135 140

Lys Thr Asp Gly Val Thr Gly Trp Pro Glu Val Glu Lys Arg Phe Tyr
 145 150 155 160

Val Met Thr Met Thr Asn Asn Gly Leu Leu His Arg Ser Arg Phe Gly
 165 170 175

Glu Cys Ile Gly Met Lys Ser Thr Glu Phe Ala Leu Ala Leu Phe Asp
 180 185 190

Ala Leu Ala Arg Arg Glu Asn Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Met Asn
 195 200 205

Glu Leu Lys Glu Phe Trp Lys Gln Ile Thr Asp Gln Asp Phe Asp Ser
 210 215 220

Arg Leu Arg Thr Phe Phe Ala Met Val Asp Lys Asp Ser Asp Gly Arg
 225 230 235 240

Leu Asn Glu Ala Glu Val Arg Glu Ile Ile Thr Leu Ser Ala Ser Ala
 245 250 255

Asn Glu Leu Asp Asn Ile Arg Arg Gln Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Leu
 260 265 270

Ile	Met	Glu	Glu	Leu	Asp	Pro	Tyr	His	Tyr	Gly	Tyr	Ile	Met	Ile	Glu
		275					280					285			
Asn	Leu	Glu	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Met	Gln	Asp	Val	Arg	Asp
	290					295					300				
Gly	Glu	Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Met	Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Met	Val
305					310					315					320
Pro	Gln	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Ala	Arg	Phe	Cys	Arg	Gly	Met	Lys	Tyr
				325					330					335	
Phe	Leu	Phe	Asp	Asn	Trp	Lys	Arg	Val	Trp	Val	Met	Ala	Leu	Trp	Ile
			340					345					350		
Gly	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	Phe	Thr	Trp	Lys	Phe	Met	Glu	Tyr	Arg	Lys
		355					360					365			
Arg	Ser	Ala	Tyr	Glu	Val	Met	Gly	Val	Cys	Val	Cys	Ile	Ala	Lys	Gly
	370					375					380				
Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Asn	Met	Ala	Met	Ile	Leu	Leu	Pro	Val
385					390					395					400
Cys	Arg	Asn	Thr	Ile	Thr	Trp	Leu	Arg	Thr	Lys	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala
				405					410					415	
Ile	Val	Pro	Phe	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Val	Ile	Ala	Ile
			420					425					430		
Gly	Ile	Ser	Val	Gly	Val	Gly	Ile	His	Ala	Thr	Ser	His	Leu	Ala	Cys
	435						440					445			
Asp	Phe	Pro	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Asp	Gln	Tyr	Glu	Pro	Met
	450					455					460				
Glu	Lys	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gln	Thr	Lys	Arg	Tyr	Leu	Asp	Phe	Val	Gln
465					470					475					480
Ser	Val	Glu	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Val	Val	Leu	Met	Thr	Ile
				485					490					495	
Ala	Phe	Thr	Leu	Ala	Thr	Thr	Trp	Phe	Arg	Arg	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu
			500					505					510		
Pro	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Phe	Asn	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser
		515					520					525			
His	His	Leu	Phe	Val	Ile	Val	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Val	His	Gly	Phe
	530					535					540				
Tyr	Val	Tyr	Leu	Ile	Ile	Glu	Pro	Trp	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Trp	Met
545					550					555					560
Tyr	Leu	Met	Val	Pro	Val	Val	Leu	Tyr	Leu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg
				565					570					575	
Ala	Phe	Arg	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Leu	Lys	Val	Ala	Val
			580					585					590		
Leu	Pro	Gly	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	His	Leu	Ser	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe
		595					600					605			
Arg	Tyr	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Met	Tyr	Leu	Asn	Cys	Ser	Ala	Val	Ser
	610					615					620				
Thr	Leu	Glu	Trp	His	Pro	Phe	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp
625					630					635					640
Tyr	Leu	Ser	Val	His	Ile	Arg	Val	Leu	Gly	Asp	Trp	Thr	Lys	Gln	Leu
				645					650					655	

Arg Ser Leu Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Arg Pro Pro Asp Glu His
 660 665 670
 Arg Leu Asn Arg Ala Asp Ser Lys His Trp Asp Tyr Ile Pro Asp Phe
 675 680 685
 Pro Arg Ile Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr
 690 695 700
 Lys Lys Phe Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 705 710 715 720
 Pro Met Ile Ser Ile Val Ser Asp Ile Ile Asn Asn Leu Lys Gly Val
 725 730 735
 Glu Glu Gly Ser Asn Arg Arg Gln Ser Pro Ile His Asn Met Val Thr
 740 745 750
 Pro Pro Val Ser Pro Ser Arg Lys Ser Glu Thr Phe Arg Thr Lys Arg
 755 760 765
 Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe
 770 775 780
 Lys Asn Val Met Asp Glu Val Thr Glu Thr Asp Arg Lys Asn Val Ile
 785 790 795 800
 Glu Leu His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg
 805 810 815
 Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys His Gly
 820 825 830
 Val Asp Val Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Arg Pro
 835 840 845
 Asn Trp Arg Ser Val Phe Lys Arg Ile Ala Val Asn His Pro Lys Thr
 850 855 860
 Arg Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Lys Glu Leu
 865 870 875 880
 Arg His Leu Ser Leu Asp Phe Ser His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Ile
 885 890 895
 Phe His Lys Glu Asn Phe
 900

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 23

garcaaggct cttttgattg

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 24

gaaatgctcc ttatggaatt c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/07589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 1, 8 January 2002 (2002-01-08), pages 517-522, XP002261415</p> <p>January 8, 2002</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2003

Date of mailing of the international search report

28/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/07589

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/E 3/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 11, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 126, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 53, no. 372, May 2002 (2002-05), pages 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 the whole document</p> <p>---</p>	
P,X	<p>HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, vol. 38, no. Special Issue 2, 2002, pages 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 page 459, right-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to Cladosporium fulvum."</p> <p>PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, vol. 61, no. 4, October 2002 (2002-10), pages 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 page 231, left-hand column, paragraph 2 -page 232, left-hand column, paragraph 1; figure 4 page 234, left-hand column, paragraph 3</p>	
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species."</p> <p>PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol. 119, no. 1, September 2003 (2003-09), pages 56-68, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) the whole document</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/E 3/07589

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 1, 8. Januar 2002 (2002-01-08), Seiten 517-522, XP002261415</p> <p>January 8, 2002</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, Bd. 11, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 126, Nr. 3, Juli 2001 (2001-07), Seiten 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Bd. 53, Nr. 372, Mai 2002 (2002-05), Seiten 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
P,X	<p>HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, Bd. 38, Nr. Special Issue 2, 2002, Seiten 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 Seite 459, rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-20
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to <i>Cladosporium fulvum</i>." PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 61, Nr. 4, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 Seite 231, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 232, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 4 Seite 234, linke Spalte, Absatz 3</p> <p>---</p>	
	<p>--- -/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, Bd. 119, Nr. 1, September 2003 (2003-09), Seiten 56-68, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) das ganze Dokument -----</p>	

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009820 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
15/24, A01H 5/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007589

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2003 (14.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 327.0 22. Juli 2002 (22.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE];
c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOGEL, Karl-Heinz
[DE/DE]; Berggartenstr. 7, 35457 Lollar (DE). HÜCK-
ELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392
Giessen (DE). TRUJILLO, Marco [DE/DE]; Heegstrauch
Weg 10, 35394 Giessen (DE).

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; ., 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des geänderten
internationalen Recherchenberichts: 11. März 2004

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 11/2004 vom 11. März 2004, Sec-
tion II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING THE PATHOGENIC RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining or increasing the pathogenic resistance in plants by reducing the
expression, activity or the functioning of a NADPH oxidase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch
Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

WO 2004/009820 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/EP 03/07589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 1, 8 January 2002 (2002-01-08), pages 517-522, XP002261415</p> <p>January 8, 2002</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p>-/---</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2003

Date of mailing of the international search report

29. 12. 03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int lional Application No
 PCT/EP 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 11, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 126, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 53, no. 372, May 2002 (2002-05), pages 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 the whole document</p> <p>---</p>	
P,X	<p>HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, vol. 38, no. Special Issue 2, 2002, pages 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 page 459, right-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In onal Application No

Pc P 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to Cladosporium fulvum."</p> <p>PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, vol. 61, no. 4, October 2002 (2002-10), pages 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 page 231, left-hand column, paragraph 2 -page 232, left-hand column, paragraph 1; figure 4 page 234, left-hand column, paragraph 3</p> <p>---</p>	
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species."</p> <p>PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol. 119, no. 1, September 2003 (2003-09), pages 56-58, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In 1ales Aktenzeichen

PCT/JP 03/07589

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch-Nr.
A	TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 1, 8. Januar 2002 (2002-01-08), Seiten 517-522, XP002261415 January 8, 2002 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29. 12. 03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEHÖRIGEN UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, Bd. 11, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 126, Nr. 3, Juli 2001 (2001-07), Seiten 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Bd. 53, Nr. 372, Mai 2002 (2002-05), Seiten 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
P,X	<p>HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, Bd. 38, Nr. Special Issue 2, 2002, Seiten 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 Seite 459, rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-20
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to <i>Cladosporium fulvum</i>." PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 61, Nr. 4, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 Seite 231, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 232, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 4 Seite 234, linke Spalte, Absatz 3</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen

P 03/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEHÖRIGEN UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, Bd. 119, Nr. 1, September 2003 (2003-09), Seiten 56-58, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

- 10 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten
- 15 in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz gegen
- 20 Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
- 25 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe
- 30 wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester
- 35 (BTH; Bion®) bewirkt werden (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82). Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- 40
- In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH
- 45 (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjær MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Durch klassische Züchtung erhaltene Mlo-defiziente Gerstensorten werden bereits in der Landwirtschaft

verwendet. Vermutlich aufgrund der Rezessivität hat sich trotz eines intensiven Anbaus die Resistenz als dauerhaft erwiesen. Mlo-ähnliche Resistenzen in anderen Pflanzen v.a. in Getreidearten sind nicht beschrieben. Das Mlo-Gen und verschiedene Homologe aus anderen Getreidearten wurde identifiziert und kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schultze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; 5 WO 99/47552). Nachteilig ist, dass der Mlo-vermittelte Abwehrmechanismus ein spontanes Absterben von Blattzellen umfasst (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Nachteilig ist ferner, dass die Mlo-defizienten Genotypen eine Hypersenszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* 10 (*M. grisea*) sowie *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) zeigen (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133). 15

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; z.B. Superoxid (O_2^-), Hydroxylradikale und H_2O_2) wird eine wichtige protektive Funktion in der Reaktion auf pflanzliche Pathogene zugeordnet (Wojtaszek P (1997) Biochem J 322:681-692). Es sind verschiedene Wege bekannt, wie eine Zelle ROS zu produzieren vermag. In den Makrophagen von Säugetieren ist hier insbesondere die NADPH 20 Oxidase zu nennen, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen vermag. Homologe Enzyme wurden auch in Pflanzen identifiziert (Lamb & Dixon (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:251). 25

Es wurde gezeigt, dass Mutationen in der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase in *Arabidopsis thaliana* eine verminderte Akkumulation reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) zeigen. In Bezug auf die Hypersensitive Reaktion (HR) war das Bild uneinheitlich: Bei einer Doppelmutante wurde bei Infektion mit dem 30 avirulenten *Pseudomonas syringae* Bakterium eine verminderte HR gefunden, während mit dem virulenten Oomyceten *Peronospora parasitica* eine erhöhte HR detektiert wurde. Das Wachstum - sowohl von virulenten als auch von avirulenten *P.syringae* Stämmen - war jedoch - im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen - nicht verändert 35 (Torres MA et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:517-522). Ebenso hatte die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels des Inhibitors Diphenyliodoniumchlorid (DPI) - bei Einsatz physiologisch relevanter Konzentrationen - keinen Effekt auf die Entwicklung pathogener Pilze (Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant 40 Microbe Interact 11:292-300). Ein cDNA Fragment einer Phagozyten NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox, Homolog der großen Untereinheit 45

gp91phox einer Phagozyten NADPH-Oxidase) ist unter der GenBank Acc.-No.: AJ251717) beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrum von Pathogenen in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

10

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

15

a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und

20 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

Überraschenderweise zeigt die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox) in der epidermalen Zelle durch einen sequenzspezifischen RNA-Interferenz Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger pNAox-dsRNA ("Gene-Silencing") einen signifikant reduzierten Befall infolge einer Bgh-Infektion (gemessen anhand der Haustorium-Ausbildung). Dieser Befund ist insbesondere des-

30 halb überraschend, da der mit der NADPH-Oxidase in Verbindung gebrachten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative burst") im allgemeinen eine protektive Funktion zugemessen wird.

Ähnlich wie Mlo vermittelt die Verminderung der NADPH-Oxidase Expression eine breite Resistenz gegen verschiedene Isolate von Blumeria graminis f.sp. hordei. In transienten "Gene-Silencing"-Experimenten wird dabei die Penetrationseffizienz (Haustorien-Bildung) von Bgh signifikant um mehr als 35 % reduziert - ein Effekt, der in seiner Stärke dem mittels Mlo-dsRNA erreichten

40 entspricht (Schweizer P et al. (2000) Plant J 24:895-903). In der Wildtyp Gerstensorte Pallas führen ca. 40 % der Pilzpenetrationen zu einer Haustorien-Bildung, wohingegen die Penetrationsrate bei einer Verminderung der NADPH-Oxidase Expression mittels Einbringen einer doppelsträngigen RNA der NADPH-Oxidase (pNAox-

45 dsRNA) nur ca. 25 % beträgt. Die Tatsache, dass auch in pathogenempfindlichen Wildtyp-Sorten wie Pallas nur eine Penetration von ca. 40 bis 50 % beobachtet werden kann, ist auf die stets

vorhandene Basalresistenz zurückzuführen. Die NADPH-Oxidase ist aufgrund der dieser Befunde als Schlüsselement für das erfolgreiche Eindringen eines Pathogens wie Bgh in die pflanzliche Zelle zu verstehen. Darüberhinaus ist das Verfahren allen 5 Verfahren überlegen, bei denen ein pathogen-resistenter Phänotyp durch Überexpression eines resistenzvermittelnden Proteins realisiert wird. Das Ausschalten eines Gens, lässt sich ohne Expression eines (Fremd)-Proteins realisieren. Im Idealfall wird lediglich das endogene Gen deaktiviert. Dies hat nicht zu ver- 10 nachlässigende Vorteile bei der Zulassung und der Akzeptanz durch den Verbraucher, der Pflanzen mit Fremdproteinen oft mit Vorbehalt begegnet. Ganz besonders vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von induzierbaren Promotoren zur Verminderung der NADPH-Oxidasemenge, Aktivität oder Funktion, was beispielsweise bei Verwendung von pathogeninduzierbaren Promotoren eine 15 Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. Bevorzugt auf solche, in denen natür- 20 licherweise eine NADPH-Oxidase oder ein funktionelles Äquivalent derselben exprimiert wird.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. 25 Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder 30 strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispiel- 35 haft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, 40 Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus 45 ein.

5

Der Begriff "Pflanze" umfasst bevorzugt monokotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

5

Ferner umfasst der Begriff dikotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

10 - Brassicaceae wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlrarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

15 - Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Flachs, Roter Pfeffer, 20 Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuss- und Weinarten. Baumarten umfasst bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, 25 Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Ferner umfasst sind Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen wie beispielhaft aber nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, 30 Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, 35 Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders 40 bevorzugt monokotyle Gattungen und Arten, wie die beschriebenen Getreidearten.

Ganz besonders bevorzugt wird das Verfahren auf monokotyle Pflanzen, am meisten bevorzugt auf Pflanzen mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, 45

Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr angewendet.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von
5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein
Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen
aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beein-
trächtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages,
der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel
10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung
des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Patho-
genresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten
15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen
Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangs-
pflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht ange-
wendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie bei-
spielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine
20 erhöhte Resistenz gegen ein und mehr Pathogene aufweist. Dabei
äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten
Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome -
neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise
die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder
25 pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf
denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt
um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um
mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens
70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %
30 vermindert.

"Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied
oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen min-
destens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren,
35 die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogen-
resistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogen-
infektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion)
aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die
Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung
40 zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise
jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze,
tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden.
45 Besonders bevorzugt sind Pilze wie beispielsweise der Mehltau. Es
ist jedoch anzunehmen, dass die Verminderung der Expression einer
NADPH-Oxidase, ihrer Aktivität oder Funktion auch eine Resistenz

gegen weitere Pathogene bewirkt. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene:

5

Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti).

10

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

15

	Erkrankung	Pathogen
	Braunrost	Puccinia recondita
	Gelbrost	P. striiformis
20	Echter Mehltau	Erysiphe graminis / Blumeria graminis
	Spelzenbräune	Septoria nodorum
	Blattdürre	Septoria tritici
	Ährenfusariosen	Fusarium spp.
25	Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
	Flugbrand	Ustilago spp.
	Weizensteinbrand	Tilletia caries
	Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
30	Anthracnose leaf blight	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola)
	Anthracnose stalk rot	Politis; Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcatum Went)
	Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
35	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
	Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
40	Black kernel rot	Lasioidiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
	Borde blanco	Marasmiellus sp.
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
45	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina

	Erkrankung	Pathogen
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
5	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Coch- liobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (tele- omorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuber- culata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
10	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
15	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seed- ling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
20	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau

	Erkrankung	Pathogen
25	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
30	Green ear downy mi- ldew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
35	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
40	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)

	Erkrankung	Pathogen
5	Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, 10 Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
15	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
	Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
20	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
	Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
25	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
	Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
30	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
35	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
	Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
	Late wilt	Cephalosporium maydis

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
20	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
25	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
25	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
30	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
35	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
35	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
40	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
40	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
45	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10		
15	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
	Rust, common corn	Puccinia sorghi
	Rust, southern corn	Puccinia polysora
	Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae
20	Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
30		
	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
35	Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
	Smut, common	Ustilago zeae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei snapdragon (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschnitzel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

13

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Umicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelötter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
 - Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halnbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und
 45 Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f. sp. hordei) und Weizen (f. sp. tritici)), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria nodorum* und *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 3: Bakterielle Erkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
	Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
	Bacterial stalk rot	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
25	Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
	Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
	Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
30	Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
	Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
35	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
	Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
	Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
40	Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:

45 *Corynebacterium sepedonicum* (Bakterienringfäule an Kartoffel), *Erwinia carotovora* (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), *Erwinia amylovora* (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), *Streptomyces*

15

scabies (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

3. Virale Pathogene:

10

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaiv Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 4: Virale Erkrankungen

20

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
25 Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
30 Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
35 Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
40 Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
45 Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)

	Krankheit	Pathogen
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
5	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
10	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
15	Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
20	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
25	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
30	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
35	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
40	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
45	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

- 5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind
- 10 Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica barberi* ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecim-punctata* ("southern corn rootworm"), *Diabrotica virgifera* ("Western corn rootworm"), *Agrotis ipsilon* ("black cutworm"),
- 15 *Crymodes devastator* ("glassy cutworm"), *Feltia ducens* ("dingy cutworm"), *Agrotis gladiaria* ("claybacked cutworm"), *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus* ("wireworm"), *Aeolus mancus* ("wheat wireworm"), *Horistonotus uhlerii* ("sand wireworm"),
- 20 *Sphenophorus maidis* ("maize billbug"), *Sphenophorus zeae* ("timothy billbug"), *Sphenophorus parvulus* ("bluegrass billbug"), *Sphenophorus callosus* ("southern corn billbug"), *Phyllogphaga* spp. ("white grubs"), *Anuraphis maidiradicis* ("corn root aphid"), *Delia platura* ("seedcorn maggot"),
- 25 *Colaspis brunnea* ("grape colaspis"), *Stenolophus lecontei* ("seedcorn beetle") und *Clivinia impressifrons* ("lender seedcorn beetle").

- 30 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Große Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

- 35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

40 Tabelle 6: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
45 Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chaltoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25

Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Hafer-

30

zystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zucker-

35

rübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

40

1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: Puccinia graminis f.sp. hordei (barley stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV),

45

19

- Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Schizaphis graminum* (greenbug); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Euschistus servus* (brown stink bug); *Deliaplatura* (seedcorn maggot); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Petrobia latens* (brown wheat mite).

2. Sojabohne:

- 10 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp.glycinea, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*,
15 *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

- 25 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatilis* (velvetbean caterpillar); *Plathypena scabra* (green cloverworm); *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm);
30 *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle); *Myzus persicae* (green peach aphid); *Empoasca fabae* (potato leaf hopper); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestanii* (strawberry spider mite);
35 *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

40

3. Canola:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*,
45 *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

- Pilz,, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganese* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*,
 5 *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
 10

5. Weizen:

- Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*,
 15 *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*,
 20 *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrachum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*,
 25 *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust),
 30 *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)
 35
 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata* (army worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western cutworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera punctata* (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum* (greenbug); *Macrosiphum avenae* (English grain aphid); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper);
 40
 45

21

Melanoplus differentialis (differential grasshopper);
 Melanoplus sanguinipes (migratory grasshopper); Mayetiola
 destructor (Hessian fly); Sitodiplosis mosellana (wheat
 midge); Meromyza americana (wheat stem maggot); Hylemya
 5 coarctata (wheat bulb fly); Frankliniella fusca (tobacco
 thrips); Cephus cinctus (wheat stem sawfly); Aceria tulipae
 (wheat curl mite);

6. Sonnenblume:

10

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora
 halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria
 helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alter-
 naria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macro-
 15 phomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae,
 Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi,
 Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora,
 Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo
 tragopogonis.

20

Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana (sun-
 flower bud moth); Homoeosoma electellum (sunflower moth);
 zygogramma exclamationis (sunflower beetle); Bothyrus
 gibbosus (carrot beetle); Neolasioptera murtfeldtiana
 25 (sunflower seed midge);

7. Mais:

30

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium monili-
 forme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium monili-
 forme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella
 maydis (Diplodia maydis), Pythium irregulare, Pythium debarya-
 num, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum,
 Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis
 35 0, T (Cochliobolus heterostrophus), Helminthosporium carbonum
 I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I,
 II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis,
 Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi,
 Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macro-
 40 phomina phaseolina, Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae,
 Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inae-
 qualis, Curvularia pallescens, Clavibacter michiganese subsp.
 nebraskense, Trichoderma viride, Maize Dwarf Mosaic Virus A
 & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus,
 45 Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, Erwinia chrysanthemi
 p.v. Zea, Erwinia carotovora, Cornstunt spiroplasma, Diplodia
 macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora

sorghi, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zea*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, 5 Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European 10 corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Spodoptera frugiperda*. (fall armyworm); *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Diatraea saccharalis* (surgarcane borer); *Diabrotica virgifera* (western corn 15 rootworm); *Diabrotica longicornis barberi* (northern corn rootworm); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); *Melanotus* spp. (wireworms); *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer; white grub); *Cyclocephala immaculata* (southern masked chafer; white grub); *Popillia japonica* 20 (Japanese beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Anuraphis maidiradicis* (corn root aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus sanguinipes* 25 (migratory grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Agromyza parvicornis* (corn blot leafminer); *Anaphothrips obscurus* (grass thrips); *Solenopsis milesta* (thief ant); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

30 8. Sorghum:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), 40 *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, 45 *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

Sclerospora graminicola, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

- 5 Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus* (sorghum borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn ear-worm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser corn-stalk borer); *Feltia subterranea* (granulate cutworm); *Phyllophaga crinita* (white grub); *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus* spp. (wireworm); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle);
- 10 *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Siphaflava* (yellow sugarcane aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Contarinia sorghicola* (sorghum-midge); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite);
- 15 *Tetranychus urticae* (two spotted spider mite).

9. Baumwolle:

- 20 Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); *Anthonomus grandis grandis* (boll weevil); *Aphis gossypii* (cotton aphid); *Pseudatomoscelis seriatus* (cotton fleahopper); *Trialeurodes abutilonea* (bandedwinged whitefly);
- 25 *Lygus lineolaris* (tarnished plant bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca* (tobacco thrips); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite); *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite);
- 30

10. Reis:

- 35 Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Colaspis brunnea* (grape colaspis); *Lissorhoptrus oryzophilus* (rice water weevil); *Sitophilus oryzae* (rice weevil); *Nephotettix nigropictus* (rice leafhopper); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug);
- 40

11. Raps:

- 45 Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae* (cabbage aphid); *Phyllotreta cruciferae* (Flea beetle); *Mamestra conjugata* (Bertha armyworm); *Plutella xylostella* (Diamond-back moth); *Delia* ssp. (Root maggots).

"NADPH-Oxidase" meint im Rahmen der Erfindung all solche Enzyme, die als wesentliche Eigenschaft befähigt sind mittels eines Einzelelektronentransfers molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. Bevorzugt sind die Enzyme die durch die EC-Klasse E.C.1.23.45.3 beschrieben werden. Dabei kann die NADPH-Oxidase aus einem oder mehr Polypeptiden bestehen, die gleich oder unterschiedlich sein können.

Bevorzugt ist die NADPH-Oxidase ein Flavocytochromprotein und umfasst als prosthetische Gruppen ein Cytochrom b und/oder eine FAD Einheit. Die NADPH-Oxidase kann aus einem $\alpha\beta$ Heterodimer bestehen, wobei die β Untereinheit die funktionelle Untereinheit des Flavocytochroms darstellen und als Glykoprotein die Elektronentransportkomponenten umfassen kann (eine hydrophile, zytosolische, C-terminale Domäne, welche NADPH und FAD enthält, sowie 4 bis 6 N-terminale, putative Transmembrane- α -Helixes, welche zwei Histidin-komplexierte prosthetische Haem-Gruppen enthält). Die α -Untereinheit kann eine C-terminale, Prolin-reiche Sequenz umfassen, welche potentielle zytosolische, aktivierende Faktoren der NADPH-Oxidase zu binden vermag. Durch die Bindung der zytosolischen phox Proteine (z.B. p47-phox, p67-phox, p40-phox) und p21rac - ein GTP-bindendes Protein - kann Aktivierung erfolgen.

Dem Fachmann sind zahlreiche NADPH-Oxidase aus pflanzlichen Organismen bekannt (u.a. Torres MA et al. (1998) Plant J 14: 365-370). Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien die Sequenzen mit nachfolgenden GenBank Acc.-No. zu nennen: AJ251717 (*Hordeum vulgare*), AP003560 (*Oryza sativa* var. *japonica*), AJ320505 (*Nicotiana tabacum*), AB050660 (*Solanum tuberosum*), AF088276 (*Lycopersicon esculentum*), AB008111 (*Arabidopsis thaliana*; Atrboh F), AF055357 (*Arabidopsis thaliana*; RbohD), AJ309006 (*Nicotiana tabacum*; rboh), AP003271 (*Oryza sativa* cv. *japonica*), AF055355 (*Arabidopsis thaliana*; RbohC), AF055353 (*Arabidopsis thaliana*; RbohA). Insbesondere bevorzugt sind die NADPH-OXIDASEN, die eine Sequenz gemäß SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 umfassen.

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden. Beispielfhaft seien dabei Sequenzen mit nachfolgenden GenBank Acc.-No. zu nennen: CAC51517.1, AJ251717, T03973, BAB68079.1, AP003560, T02024, CAC87256.1, AJ320505, BAB70750.1, AB050660, AF088276_1, NP_564821.1, NM_105079, T00265 AC007764_16, NP_192862.1, NM_117194, AF147783_1, AAM28891.1, AF506374, CAC84140.1, AJ309006, T51804, NP_199602.1,

NM_124165, BAB89740.1, AP003271, AAC39477.1, AF055355,
 NP_199919.1, NM_124485, AAC39475.1, AF055353, NP_196356.1,
 NM_120821, NP_194239.1, NM_118641, BAB08369.1, AB015475,
 AAC39478.1, AF055356, AC069143_9, NP_173357.1, NM_101781,
 5 NP_172383.1, NM_100780, AAB70398.1, AC000106, AAC39476.1,
 AF055354, BAB70751.1, AB050661, BAB63664.1, AP003275, AAD24966.1,
 AF109150.

Besonders bevorzugt umfasst die Polypeptidsequenz der NADPH-
 10 Oxidase mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe
 von Sequenzmotiven bestehend aus

- i) AL(K/R)GL(K/R)
- ii) DK(N/D)XDG(R/K)(I/L/V)(T/N)E
- 15 iii) LSASAN
- iv) IMEELDP
- v) K(F/L)NMA(I/L)(I/V)LXPVCRN
- vi) (E/Q)WHPFSIT
- vii) S(A/S)PXDD(Q/Y)(L/I)S(I/V)H(V/I/L)R
- 20 viii) DGPYG(S/A)PAGDY
- ix) L(I/V)GLGIGATP
- x) FYWVTREQGSF
- xi) GVFYCG

25 Ganz besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2
 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten
 bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der
 Sequenzmotive i), ii), iii), iv), v), vi) vii), viii), ix) x)
 und xi). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Amino-
 30 säuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser
 Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

NADPH-Oxidase kann aber auch jede andere Einheit eines NADPH-
 Oxidase Enzymkomplexes meinen der wesentlich für Aktivität der
 35 NADPH-Oxidase ist.

"Proteinmenge" meint die Menge eines NADPH-Oxidase-Polypeptides
 in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zell-
 kompartment. "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengen-
 40 mäßige Verminderung der Menge einer NADPH-Oxidase in einem
 Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment
 - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren -
 im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den
 dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen
 45 Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter
 der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens
 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders

bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

- 5 "Aktivität" meint die Fähigkeit einer NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. "Verminderung" der Aktivität meint die Verminderung der Gesamt-Aktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines
- 10 der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens
- 15 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

- "Funktion" meint bevorzugt die Substratbindekapazität einer
- 20 NADPH-Oxidase in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. Als Substrate kommen niedermolekulare Verbindungen wie NADPH oder FAD aber auch die Proteininteraktionspartner einer NADPH-Oxidase in Frage.

- 25 "Verminderung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Verminderung der Bindekapazität oder Bindestärke einer NADPH-Oxidase zu mindestens einem Substrat in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu
- 30 dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Unter Verminderung ist auch die Veränderung der Substratspezifität zu verstehen, wie sie beispielsweise durch den k_{cat}/K_m -Wert
- 35 ausgedrückt werden kann. Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %. Bindepartner für NADPH-Oxidase können
- 40 beispielsweise durch das Hefe-2-Hybridsystem in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

- Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge, der Aktivität von NADPH Oxidasen oder der Substratbindekapazität sind dem Fachmann
- 45 bekannt. Beispielsweise kann die NADPH abhängige, DPI-inhibierbare O_2^- oder H_2O_2 Produktion (z.B. über Nitro-Blau-Tetrazolium [NBT] oder Cytochrom c Reduktion) gemessen werden. Die Protein-

menge kann beispielsweise immunologisch unter Verwendung entsprechender Antikörper bestimmt werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Yu L et al. (1999) Blood 94(7):2497-504; Doke N (1983a) Physiol Plant Pathol 23:345-357; Levine A et al. (1994) 5 Cell 79:583-593; Tenhaken R et al. (1995) Proc Nat Acad Sci USA 92: 4158-4163; Sagi M & Fluhr R. (2001) Plant Physiol 126(3):1281-90; Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant Microbe Interact 11:292-300; so wie in den vorgenannten Artikeln zitierten Referenzen).

10

"Funktionelle Äquivalente" eines NADPH-Oxidase-Proteins meint bevorzugt solche Sequenzen, die von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abgeleitet oder zu dieser homolog sind und

15 die gleichen wesentlichen Eigenschaften aufweisen.

Dabei kann die Effizienz der Pathogenresistenz sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abweichen. Bevorzugt sind solche funktionelle Äquivalente, bei denen sich die Effizienz der Pathogenresistenz - gemessen beispielsweise an der Penetrationseffizienz eines Pathogens (Haustoriumbildung) - um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %,

25 besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten unter Verminderung einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, bei deren Verminderung die Effizienz der Pathogenresistenz quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 übersteigt.

35

Der Vergleich wird bevorzugt unter analogen Bedingungen durchgeführt. "Analoge Bedingungen" bedeutet, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Kultur- oder Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate, Pathogenkonzentration etc.) zwischen den zu vergleichenden Versuchen identisch gehalten werden und die Ansätze sich allein durch die Sequenz der zu vergleichenden NADPH-Oxidasen, ihrem Ursprungsorganismus und gegebenenfalls dem Pathogen unterscheiden. Bei Wahl des Pathogens ist für den Vergleich jeweils das Pathogen 40 zu wählen, das dem jeweils anderen - unter Berücksichtigung der Artspezifität - am nächsten kommt.

- "Funktionelle Äquivalente" meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise *Arabidopsis thaliana*) können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden. Entsprechende Sequenzen sind oben mit GenBank Acc-No. beispielhaft aufgeführt.
- 15 Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Polypeptides umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 erhält.

- Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 30 Gap Weight: 50 Length Weight: 3
- Average Match: 10 Average Mismatch: 0

- Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

- 40 Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

- 5 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.
- 10 Funktionelle Äquivalente, abgeleitet von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 durch Substitution, Insertion oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem Polypeptid umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 und zeichnen sich durch die gleichen wesentlichen Eigenschaften
- 20 wie diese aus.

- Funktionelle Äquivalente, abgeleitet einer eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 umfassenden NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz durch Substitution, Insertion
- 25 oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem der erfindungsgemäßen Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 und kodieren für Polypeptide mit den
- 30 gleichen wesentlichen Eigenschaften wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

- Auch die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen-Bibliotheken
- 35 anderer Organismen, bevorzugt von den weiter unten genannten als Wirt zur Transformation geeigneten Pflanzenarten, unter Verwendung der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde, ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe
- 40 in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten
- 45 bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,

13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

- Funktionelle Äquivalente umfasst DNA Sequenzen, die unter
- 5 Standardbedingungen mit der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenzen, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder teilen der vorgenannten hybridisieren und als vollständige Sequenzen für Proteine kodieren, die die gleichen wesentlichen
- 10 Eigenschaften haben wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

- "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs-
- 15 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),
- 20 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

- Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und
- 25 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben
- 30 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegen-
- 35 wart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

- (1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden
- 40 Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
- b) 6X SSC bei 45°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA),
- 45 c) 6X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)

31

- d) 4XSSC, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierter Fischesperma-DNA)
- e) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- f) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschrirte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

Die Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder der NADPH-Oxidase-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

20

"Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer NADPH-Oxidase, einer NADPH-Oxidase Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische

- Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen. Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung einer NADPH-Oxidase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der NADPH-Oxidase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des NADPH-Oxidase-Proteins). Dabei können einer oder mehrere essentielle Einheiten der NADPH-Oxidase vermindert werden. Dabei wird die Expression eines bestimmter NADPH-Oxidase oder die NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90% vermindert.

- Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion umfasst. Beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - seien zu nennen:

45

- a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA) oder einer deren Expression gewährende leistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 5 b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährende leistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein NADPH-Oxidase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein NADPH-Oxidase-Gen-
10 transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen.
- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren
15 Expression gewährende leistenden Expressionskassette
- d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression
20 gewährende leistenden Expressionskassette
- e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährende leistenden Expressionskassette
25
- f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährende leistenden Expressionskassette
- 30 g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- h) Einführen von Mutationen in endogenen NADPH-Oxidase Gene
35 zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression, NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-
40 Oxidase-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des NADPH-Oxidase-Proteins, des Transports des NADPH-Oxidase-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomen-
45 anlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines NADPH-

Oxidase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz

5 beschrieben:

a) Einbringung einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA)

- 10 Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; 15 WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation 20 gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. 25 Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

- Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression als besonders effizient und vorteilhaft 30 erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher 35 auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Samen) die Verminderung eines NADPH-Oxidase bewirken.

- 40 Das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu 45 zumindest einem Teil einer NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz, und

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

5 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins

- 10 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein, und
- 15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

20 In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

- Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch
- 25 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der NADPH-Oxidase Zielsequenz oder einer funktionell äquivalenten Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben (bzw. zwischen
- 35 dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben).

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen,

40 bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als

45 Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Speicherprotein Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B.

in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

- "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

- "Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einer für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt von einem NADPH-Oxidase-Gen. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

- Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer Pathogenresistenz in Pflanzen.

- Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribonukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modifikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung von antisense-RNA beschrieben.

- Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

- Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch synthetisch hergestellt werden.

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

5

Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein,

10 das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

15

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

20 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

25 dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten

30 mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann

35 die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-

Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in

40 einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor inseriert

45 und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom

einer Pflanze insertiert, um eine dauerhafte Expression der dsRNA zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem NADPH-Oxidase Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der NADPH-Oxidase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der NADPH-Oxidase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die NADPH-Oxidase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenz-homologie zwischen den NADPH-Oxidase Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der NADPH-Oxidase Sequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen NADPH-Oxidase-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten NADPH-Oxidase-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer NADPH-Oxidase-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen verwandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von NADPH-Oxidase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) gebracht werden. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Poly-

adenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden.

- 5 Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder
- 10 enzymatisch in vitro syntetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die
- 15 Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

- Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA realisiert, transformiert.
- 20 miert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.

b) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz

- Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Ver-
- 25 hinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit
- 30 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch
- 35 Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

- Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung
- 40 eines NADPH-Oxidase-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden.
- 45 Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem

Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines NADPH-Oxidase-Gens (z.B. einem NADPH-Oxidase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des NADPH-Oxidase-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppel-

strängige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann
5 ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett* 215:327-330).

- c) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz
10 kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst
15 werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die
20 Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozym-sequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"anti-
25 sense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) *Nature* 334:585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) verwendet werden, um
30 die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. NADPH-Oxidase - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321
35 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet.* 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, *Methods in Cell*
40 *Biology* 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) *Plant Mol Biol.* 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) *Mol Gen Genet.*
45 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden NADPH-Oxidase Proteins aufweisen

(siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

5

d) Einbringung einer NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenz zur Induktion eines Kosuppression

- Die Expression einer NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz in sense-
- 10 Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol
- 15 Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise
- 20 representieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.
- 25 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß
- 30 SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

e) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase Gene, -RNAs oder Proteine

- 35 Eine Verminderung einer NADPH-Oxidase Genexpression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken
- 40 eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen NADPH-Oxidase Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001)
- 45 J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem

- 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

10

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines NADPH-Oxidase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden

- 15 Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer NADPH-Oxidase cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich.
- 20 Die dazu erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann geläufig.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das NADPH-Oxidase Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr

- 25 Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gen-
- 30 technisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

- 35 Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere

- 40 bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Genesequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol

Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

5

- f) Einbringung von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die NADPH-Oxidase Expression kann effektiv auch durch Induktion
10 des spezifischen NADPH-Oxidase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu den
15 zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H
20 (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

- g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen
25 Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.

Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter NADPH-Oxidase-Aktivität verwendet man beispielsweise
30 weise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen NADPH-Oxidase Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die
35 regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und vermindert wird.

- 40 Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen
45 bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird der Wirts-

organismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378)

25

h) Einführung von Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der NADPH-Oxidase-Funktion

oder Aktivität mit dominant-negativen NADPH-Oxidase-Varianten sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAI-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den NADPH-Oxidase-Proteinen aus Mais, Reis und Gerste kann auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Protein bei Pflanzen geschlossen werden. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenzen aus Gerste, Mais oder Reis auch die Expression von homologen NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen Arten effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden NADPH-Oxidase-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines NADPH-Oxidase-Proteins aus Reis, Mais oder Gerste die Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

"Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes NADPH-Oxidase Gen). Die Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein

(z.B. Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

- 5 Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

- "Anti-NADPH-Oxidase" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression
- 10 (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer NADPH-Oxidase-dsRNA oder einer NADPH-Oxidase "antisense"-RNA - bevorzugt in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe, Organ oder Samen derselben - bedingen.
- 15 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression
- 20 in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise die NADPH-Oxidase dsRNA) dort in planta erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispiels-
- 25 weise Promotoren) bevorzugt. Die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden (wie in Beispiel 6 und 7 beschrieben). In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise
- 30 Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-NAox-Ver-
- 35 bindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense
- 40 oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor-
- 45 zugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander

verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden,
- 10 wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten
- 20 Restriktionsenzymstimmstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und
- 25 durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden.

- Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen ein Promoter - zum Beispiel
- 30 durch eine homologe Rekombination - hinter ein endogenes NADPH-Oxidase-Gen platziert wird, und durch Expression einer antisense NADPH-Oxidase-RNA die erfindungsgemäße Verminderung eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirkt wird. Analog kann auch eine "anti-NADPH-Oxidase" Verbindung (zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz
- 35 kodierend für eines NADPH-Oxidase dsRNA oder eine NADPH-Oxidase antisense RNA) derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

- 40 Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

- 5 Bevorzugt sind Vektoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen
- 10 Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al.
- 15 (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-
- 20 Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen
- 25 et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von
- 30 Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

35

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

40

- Samenspezifische Promotoren umfassen zum Beispiel den Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989)
- 45 Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519),

des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388), des Legumin B4 (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Bäumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), des Oleosin aus Arabidopsis 5 (WO 98/45461) und des Bce4 aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samen- 10 spezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2- oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, 15 des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Patatin Promotor Klasse I (B33) und 20 den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), den SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat- 25 carboxylase) oder den ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind Epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

30 Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

35 Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

40 Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten 45 Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielhaft seien zu nennen der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein

durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334).

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

- Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gst1* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPK Promotor. Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *Fis1*-Promotor (WO 96/34949), den Vst1-Promotor (Schubert et al. (1997) Plant Mol Biol 34:417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpene-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).
- Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen ferner die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden, wie beispielsweise Promotoren der Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).
- Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des *pinII* Gens (EP-A 0 375 091; Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des *wun1*- und *wun2*-Gens (US 5,428,148), des *win1*- und *win2*-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des *WIP1*-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des *MPI*-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.
- Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt die

Region -364 bis -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) Plant Mol Biol 30, 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten β -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt auf. Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Abundanz durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen-induziert, sind die "acidic PR-5"-(aPR5)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol 114:79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) Plant Mol Biol 16:329-331). aPR5-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um eine erhöhte pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14, 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684;

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbar und epidermis-spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit

- zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in
- 5 prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz den Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte und 3'-stromabwärts eine Terminator-
- 10 sequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.
- 15 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren
- 20 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.
- 25 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.
- 30 Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist
- 35 gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielfür Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-
- 40 Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

- Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere
- 45 sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im 5 Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium* 10 *tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

15 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der 20 natürliche Promoter eines bestimmten Gens gegen einen Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus 25 (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine Expressionskassette und die von ihr abgeleiteten 30 Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielfähig aber 35 nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum 40 Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielfähig seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und 45 Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphono-

- methylylglycin) verleihen, das für das Glyphosat® degra-
dierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase),
das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon
inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende
5 Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil
degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das
eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin ver-
leih, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das
eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycin-
10 phosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen
Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphospho-
transferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin
vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine
Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht
15 (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder
Hra Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine
kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine
20 Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-
ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders
bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Gros-
kreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green
fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal
25 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA
94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci
USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep
16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol
6:325-330; Leffell SM et al. (1997) Biotechniques.
- 30 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase
(Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992)
Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher
et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268),
die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das
35 die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in
pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der
Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder
chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In:
Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts,
40 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz be-
sonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al.,
EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-
45 gemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel
E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin
of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori

(Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- 5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in
10 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen
desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe,
Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von
Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten
enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum
15 Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnitt-
stelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst
in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden
selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem
Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse
20 und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt
zu überprüfen.

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren
oder auch Agrobakterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungs-
25 form wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmid-
vektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine
stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom
ermöglichen.

30 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer
transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die ent-
sprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirts-
zelle eingebracht wird.

35 Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion
bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von
Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology
185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch
Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten
40 Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch,
zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so
dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA
kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden
Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen er-
45 folgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur
Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen
elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Ver-

fahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhauser et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch et al. (1985) Science 225: 1229f).

Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter pflanzlicher Organismen (s.o.) und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Außerhalb der T-DNA Region können Elemente wie ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter Agro-

bakteria oder E.coli (z.B. nptIII) umfasst sein. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein

5 so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V;

10 An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind

15 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus

20 und Zelltyp eignen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die

25 der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz

35 gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum, Herbizid oder ein Metabolismushemmer wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat WO 98/45456) verleiht(s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder

40 Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiele sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen,

45 das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von

untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Stressresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein
- 5 Promotor, oder

- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden

10 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus

15 oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens

20 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des NADPH-Oxidase-Promotors mit dem entsprechenden NADPH-Oxidase-Gen - wird zu einer trans-

25 genen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

30 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.-

35 oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen.

40 Bevorzugt sind

- a) Pilze, wie Aspergillus, Eremothecium, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Eng. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6
- 45 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii oder Eremothecium ashbyii.

- b) Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession-No. 201178),
- 5 c) Pflanzen gemäß der obengenannten Definition für "Pflanzen"
- d) Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind nicht-humane Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie *Drosophila* S2 und *Spodoptera* Sf9 oder Sf21 Zellen,
- 10
- e) prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien wie *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cyanobacter*, *Escherichia* (vor allem *Escherichia coli*), *Serratia*, *Staphylococcus*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Penicillium* oder *Klebsiella* genannt.
- 15
- 20 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. Insbesondere als Wirtsorganismen bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, auf die der erfindungsgemäße Verfahren zum Erzielen einer Pathogenresistenz gemäß oben genannten Kriterien angewendet werden kann. Ganz besonders bevorzugt sind monokotyle Pflanzen wie Weizen,
- 25
- 30 Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, als diktyledone Kulturpflanzen wie Raps, Canola, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, *Tagetes*, Salat,
- 35
- 40 *Calendula*, Melone, Kürbis oder Zucchini.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*.

6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*
- 5 7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Kartoffel
(*Solanum tuberosum*)
- 10 8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Kartoffel
(*Solanum tuberosum*)
- 15 9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)
- 20 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)
- 25 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohF)
- 30 12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis*
thaliana (RbohF)
- 35 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohD)
- 40 14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis*
thaliana (RbohD)
- 45 15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (rboh)
16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (rboh)
17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)
18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)

19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)
20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)
21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)
22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)
23. SEQ ID NO: 23 Oligonukleotidprimer 5' NAOX
5'-GARCAAGGCTCTTTTGATTG-3'
24. SEQ ID NO: 24 Oligonukleotidprimer 3' Naox
5'-GAAATGCTCCTTATGGAATTC-3'

Abbildungen

Fig. 1: "RNA Interference" mit pNAox-dsRNA vermindert die Penetrationseffizienz des Echten Gerstenmehltau BghA6 in Gerste.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) wurde in fünf individuellen Experimenten bei Inokulation mit *Bgh* aus Gerste cv Pallas bestimmt. Die RPE errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen und der Penetrationseffizienz bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\% \text{-RPE} = 100 * (\text{RPE} - 1)$$

Die Säulen "1" bis "5" stellen die %-RPE (d.h. die Abweichung der Penetrationseffizienz vom Durchschnitt der Penetrationseffizienz der Kontrolle) bei Evaluierung von mindesten 100 Interaktionsstellen für jeweils ein unabhängiges Experiment dar. Die Säule "m" stellt die durchschnittliche %-RPE der Experimente dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

"Control-dsRNA" stellt die parallelen Experimente mit einer Kontroll-dsRNA. "pNAox"-dsRNA stellt die Experimente mit der dsRNA der NADPH-Oxidase aus Gerste dar.

- 5 Die %-RPE war in Zellen, die mit pNAox-dsRNA beschossen wurden, deutlich (Signifikanz $p=0,0054$) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA (TR: humaner Thyroid-rezeptor-dsRNA) bombardiert wurden.

10 Beispiele

Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
- 15 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren
- 20 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- 25 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30 Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Sorte Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben,
- 35 (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

- Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8 cm) in Fruhstorfer Erde vom
- 40 Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16 bis 18°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis
- 45 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen

verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente

5 wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C, nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

10 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm².

20

Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit ca. 100 Konidien/mm² (soweit nicht anders angegeben).

25

Beispiel 2: Klonierung der pNAox cDNA Sequenz aus Gerste

Die zur Isolation der HvpNAox cDNA, ihrer Klonierung, Sequenzierung und Herstellung von Sonden benötigten cDNA

30 Fragmente wurden mittel RT-PCR unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland oder Qiagen, Hilden, Deutschland) erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gerste-Sämlingen als Matrize verwendet. Die RNA wurde aus Pallas 3, 5 und 7 Tage nach Keimung isoliert. Darüberhinaus wurde RNA
35 aus Pallas und den rückgekreuzten Linien mit *mlo5*, *Mlg* oder *Mla12* 1, 2 und 5 Tage nach Inokulation mit *BghA6* am 7 Tag nach Keimung isoliert. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die von konservierten Regionen der gp91phox Homologen aus Reis und Arabidopsis thaliana abgeleitet sind (GenBank Acc.-No.: X93301 bzw.
40 AB008111):

5' NAOX: 5'-GARCAAGGCTCTTTTGATTG-3' (SEQ ID NO: 23) und

3' Naox: 5' GAAATGCTCCTTATGGAATTC 3' (SEQ ID NO: 24)

Für die Reaktion (25 µL-Ansatz) wurden je 1000 ng Gesamt-RNA, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 mM OPN-1 und OPN-2 Primer, 10 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Enzymmix in 1x RT-Puffer (one step RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden) eingesetzt.

5

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100TM Modell 96V; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

- | | |
|----|--|
| 1 | Zyklus mit 30 min bei 50°C |
| 10 | 1 Zyklus mit 150 sec bei 94°C |
| 30 | Zyklen mit 94°C für 45 sec, 55°C für 1 min
und 72°C für 2 min |
| 1 | Zyklus mit 72°C für 7 min |

- 15 Die PCR Produkt wurde mittels 2% w/v Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein RT-PCR Produkt von 378 bp erhalten (SEQ ID NO: 1), das ein teil des offenen Leseraster der NADPH-Oxidase aus Gerste kodiert. Die entsprechende cDNA wurde aus einem Agarosegel isoliert und in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) mittels T-Überhang-Ligation kloniert. Die cDNAs wurden ausgehend von der Plasmid-DNA unter Verwendung des "Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham, Freiburg, Deutschland) sequenziert. Das Konstrukt wurde mit pGEM-T-pNAox bezeichnet.

25

Beispiel 3: In vitro Synthese der pNAox dsRNA

- Das Plasmid pGEM-T-pNAox, das für die in vitro RNA-Transkription eingesetzt wurde, beinhaltet den T7 und SP6 Promotor an den
- 30 jeweiligen Enden der insertierten Nukleinsäuresequenz, was die Synthese von sense- bzw. antisense RNA ermöglicht. Das Plasmide kann mit geeigneten Restriktionsenzymen (ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase) linearisiert werden, um eine korrekte Transkription der insertierten Nukleinsäuresequenz zu gewähr-
- 35 leisten und ein Durchlesen in vektorielle Sequenzen zu verhindern. Dazu wurden 10 µg pGEM-T-pNAox Plasmid-DNA jeweils mit ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase geschnitten. Die geschnittenen Plasmide werden in 200 µl Wasser mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in ein
- 40 neues Eppendorfreaktionsgefäß (RNase frei) transferiert und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. 180 µl der Plasmid-Lösung wurden mit 420 µl Ethanol versetzt, auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 g und - 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE Puffer aufgenommen.
- 45 Die jeweiligen Präparationen wurden direkt in eine in vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase bzw. SP6-RNA-Polymerase

eingesetzt. RNA Polymerasen wurden von Roche Molecular Biology, Mannheim, Deutschland bezogen.

Jeder Transkriptionsansatz beinhaltetete in einem Volumen of 40 µl:

- 5
- 2 µl linearisierte Plasmid DNA (1 µg)
- 2 µl NTP's (25 mM) (1,25 mM von jedem NTP)
- 4 µl 10xReaktionspuffer (Roche Molecular Biology),
- 1 µl RNasin RNasin (27 Units; Roche Molecular Biology),
- 10 2 µl RNA Polymerase (40 Units)
- 29 µl DEPC-Wasser

- Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze aus der Transkription des "sense"- bzw. "anti-sense"-Stranges gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch Abkühlung über 30 min auf eine Endtemperatur von 37°C miteinander hybridisiert ("annealing"). Alternativ kann nach der Denaturierung das Gemisch aus sense- und antisense-Strang auch für 30 min bei -20°C gekühlt werden. Das Protein-
- 15
 - 20 präzipitat, das sich während Denaturierung und Hybridisierung bildet wurde durch kurze Zentrifugation bei 20800 g abgetrennt und der Überstand direkt zur Beschichtung von Wolframpartikeln verwendet (s. unten). Zur Analyse wurden jeweils 1 µl jeden RNA-Stranges und der dsRNA auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel
 - 25 aufgetrennt. Eine erfolgreiche Hybridisierung zeigte sich, durch eine Bandenverschiebung zu höherem Molekulargewicht im Vergleich zu den Einzelsträngen.

- 4 µl der dsRNA wurden Ethanol-präzipitiert (durch Zugabe von 6 µl
- 30 Wasser, 1 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 25 µl Ethanol, sowie Zenrifugation für mindestens 5 min bei 20000 g und 4°C) und in 500 µl Wasser resuspendiert. Das Absorbtionsspektrum zwischen 230 und 300 nm wurde gemessen, bzw. die Absorption bei 280 und 260 nm bestimmt, um die Reinheit und die Konzentration der dsRNA
 - 35 zu bestimmen. In der Regel wurden 80 bis 100 µg dsRNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀ -Verhältnis von 1,80 bis 1,95 erhalten. Ein Verdau mit DNase I kann optional durchgeführt werden, beeinflusst jedoch nachfolgende Ergebnisse nicht wesentlich.

- 40 Als Kontroll-dsRNA fungierte die dsRNA des humanen Thyroïdrezeptors (Ausgangsvektor pT7betaSal (Norman C et al. (1988) Cell 55(6):989-1003) zur Verfügung gestellt von Dr. Baniahmad, Institut für Genetik, Gießen, Deutschland; die Sequenz des Insert ist beschrieben unter der GenBank Acc.-No.: NM_000461). Für die
- 45 Herstellung der sense-RNA wurde das Plasmid mit PvuII, für die antsense-RNA mit HindIII verdaut und die RNA dann mit T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Die einzelnen Verfahrens-

schritte zur Herstellung der Kontroll-dsRNA werden analog den oben für die pNAox-dsRNA beschriebenen durchgeführt.

Beispiel 4: Transiente Transformation, RNAi und Evaluation
5 der Pilzpathogenentwicklung

- Gerste cv Pallas Blattsegmente wurden mit einer pNAox-dsRNA zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das
- 10 Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung in eben diesen Zellen beurteilt. In allen fünf Experimenten führte die Bombardierung von Gerste cv
- 15 Pallas mit pNAox-dsRNA zu einer verminderten Anzahl von erfolgreich durch Bgh penetrierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer fremden Kontroll-dsRNA (humaner Thyroidhormonrezeptor dsRNA, TR) bombardiert wurden. Der resistenzinduzierende Effekt der pNAox-dsRNA bedingte eine durchschnittliche Verminderung der
- 20 Penetrationseffizienz durch Bgh um 35 % (Fig. 4).

- Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt das bereits für die biolistische Einführung von dsRNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer
- 25 P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1 µm (Partikeldichte 25 mg/ml) wurden mit dsRNA (Herstellung siehe oben) zusammen mit Plasmid-DNA des Vektors pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors)
- 30 als Transformationsmarker beschichtet. Dazu wurden pro Schuss die nachfolgender Mengen an dsRNA bzw. Reporterplasmid zur Beschichtung verwendet: 1 µg pGFP und 2 µg dsRNA. Dopplesträngige RNA wurde mittels Verschmelzens von "sense" und "antisense"-RNA in vitro synthetisiert (s.o.).
- 35

- Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50 %igem
- 40 Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert. Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuss 1 µg Plasmid, 2 µg dsRNA (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung
- 45 (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom

Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikeln wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

- Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremesen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6) inokuliert und für weitere 40 bis 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.
- Blattsegmente wurden mit den beschichteten Partikeln unter Verwendung einer "particle inflow gun" bombardiert. Pro Schuss wurden 312 µg Wolframpartikel appliziert. 4 h nach der Bombardierung wurde Inokulation mit *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau (Rasse A6) inokuliert und nach weiteren 40 h bezüglich der Infektionsanzeichen ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein reifes Haustorium und eine Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae") wurde mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 100 Conidia/mm² ergibt eine Angriffsfrequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine

minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

5

1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.

10

2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.

15

3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,1 %

20

Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In pNAox-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein

25

Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei transformierten

30

Zellen (Transformation mit pNAox- oder Kontroll-dsRNA) und der Penetrationseffizienz bei untransformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\% \text{-RPE} = 100 * (\text{RPE} - 1)$$

40

Der %-RPE-Wert (Abweichung von der durchschnittlichen Penetrationseffizienz der Kontrolle) dient der Bestimmung des Suszeptibilität von Zellen, die mit pNAox-dsRNA transfiziert sind (Fig. 4).

45

Bei der Kontroll-dsRNA wurde bei fünf unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen der Transfektion mit der Kontroll dsRNA und Wasser bezüglich der Penetrationseffizienz von *Bgh* beobachtet.

- 5 Um einen Einfluss auf der dsRNA auf die Transformationsrate oder Überlebensrate der angegriffenen Zellen auszuschließen, wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen Kontroll- und pNAox-dsRNA Experimenten verglichen. Die pNAox-dsRNA hatten keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl- oder die Anzahl der ange-
- 10 griffenen GFP-exprimierenden Zellen.

Beispiel 5: Inhibition der NADPH-Oxidase mit Diphenyleniodoniumchlorid

- 15 Untermuert werden die Ergebnisse durch weitere Experimente mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI; Tabelle 1). Im allgemeinen wurden die Experimente durchgeführt wie von Hückelhoven und Kogel, 1998.

- 20 Tab. 1: Wirkung von DPI auf die Pathogenabwehr in *Pallas*^a

Art der Interaktion	Interaktionen (% \pm Standardfehler)	
	Kontrolle ^b	200 μ M DPI ^c
25 Penetration	68.25 \pm 9.9	16.25 \pm 0.5
Nicht-Penetration	24.25 \pm 6.3	67.5 \pm 9.5
HR (Hypersensitive Reaktion)	7.5 \pm 3.7	16.25 \pm 9.3

30

- a DPI-Behandlung erfolgte 12 h nach Pathogen-Inokkulation, die Auswertung 36 h nach Inokkulation.

- b Kontrolle mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, mit DMSO
- 35 Gehalt wie bei DPI Behandlung.

- c DPI gelöst in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, ausgehend von einer 10 mg/ml DPI Stammlösung in DMSO.

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,
5 dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion
einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe,
Organ, Teil oder Zelle derselben und
- 10 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder
Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen
mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die NADPH-Oxidase kodiert
wird durch
- a) Polypeptidsequenzen umfassend eine Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22,
20 oder
- b) Polypeptidsequenzen eines funktionellen Äquivalentes
eines Polypeptides, welches eine Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
25 umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das funktionelle Äquivalent
eine Homologie von mindestens 50 % zu einem der Polypeptide
gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
30 hat.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Ver-
minderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer
NADPH-Oxidase gewährleistet wird durch Anwendung eines Ver-
fahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 35 a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase Ribo-
nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewähr-
leistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten,
- 40 b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäure-
sequenz oder einer deren Expression gewährleistenden
Expressionskassette,

- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 5 d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 10 e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 15 f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- g) Einbringen von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen und
- 20 h) Einführung von Mutationen in ein endogenes NADPH-Oxidase Gen.
- 25 5.. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend
- (i) die stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für
- 30 a) eine doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Ribonukleinsäuresequenz oder
- b) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder
- 35 c) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder
- d) eine NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder
- 40 e) DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine
- f) den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen
- 45

- (ii) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
- (iii) Expression besagter Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend, um eine Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
- 5
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Pilzen, Insekten, Viren und Nematoden.
- 10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.
- 20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.
- 25
10. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase umfassend
- 30
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase, und
- 35
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.
11. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 10, wobei die beiden RNA-Stränge der doppelsträngigen RNA kovalent miteinander verbunden sind.
- 40
12. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei einer der beiden RNA-Stränge kodiert wird durch zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben.
- 45

13. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Transgene Expressionskassette enthaltend zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in antisense-Orientierung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor funktionell verknüpft ist.
15. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei der in Pflanzen funktionelle Promotor ein pathogen-induzierbarer Promotor ist.
16. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15.
17. Transgener Organismus enthaltend ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Transgener Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen.
19. Transgener Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
20. Gewebe, Organ, Teil, Zelle, Zellkultur oder Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 18 oder 19.

Translation

TENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2003/007589



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000053765	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/007589	International filing date (day/month/year) 14 July 2003 (14.07.2003)	Priority date (day/month/year) 22 July 2002 (22.07.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 15/24, A01H 5/10		
Applicant BASF PLANT SCIENCE GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2004 (23.01.2004)	Date of completion of this report 15 October 2004 (15.10.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP2003/007589

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-71 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 1-20 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1/1 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/03/07589

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application relates to a method for increasing pathogenic resistance in plants by reducing the protein content, activity or function of an NADPH oxidase.

The increased resistance of barley plants to natural barley mildew is shown as an example.

2. A method that would correspond to the claimed method is not disclosed in the cited prior art. On the basis of the cited literature, a person skilled in the art would expect increased resistance to be achievable by increasing the NADPH oxidase. The subject matter of claims 1-10 can therefore be considered to be novel and to involve an inventive step.
3. A person skilled in the art would also not have been motivated to produce the double-strand RNA molecules claimed in claims 11-20 by reducing the expression of an NADPH oxidase.
4. On the other hand, it is not clear whether the claimed invention can be performed throughout its entire scope. Only one example in which a specific combination of host plant and pathogen exhibits increased resistance is shown in the application. It

cannot be inferred from that example that a reduction in the NADPH oxidase results in increased pathogenic resistance in every case. Since the present application contradicts the general teaching, one embodiment does not appear sufficient to refute this teaching.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN



PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053765	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07589	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder BASF PLANT SCIENCE GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
- I ☒ Grundlage des Bescheids
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23.01.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.10.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J Tel. +49 89 2399-8707 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-71 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-20 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Zeichnungen, Blätter

1/1 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-20
Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-20
Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-20
Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz bei Pflanzen durch Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase.
Als Beispiel wird die erhöhte Resistenz von Gerstenpflanzen auf den echten Gerstenmehltau gezeigt.
2. Im zitierten Stand der Technik wird kein Verfahren, welches dem beanspruchten Verfahren entsprechen würde, offenbart. Aufgrund der zitierten Literatur würde der Fachmann erwarten, dass eine erhöhte Resistenz durch Erhöhung der NADPH-Oxidase erzielt werden könnte. Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 kann daher als neu und auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhend angesehen werden.
3. Der Fachmann hätte auch keine Motivation, die in den Ansprüchen 11-20 beanspruchten Doppelsträngigen RNA-Moleküle zur Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase herzustellen.
4. Andererseits ist es nicht klar, ob die beanspruchte Erfindung in ihrer ganzen Breite hergestellt werden kann. In der Anmeldung wird lediglich ein Beispiel gezeigt, in der eine bestimmte Kombination von Wirtspflanze und Pathogen eine erhöhte Resistenz zeigt. Daraus kann nicht abgeleitet werden, dass eine Verringerung der NADPH-Oxidase in jedem Fall zu einer erhöhten Pathogenresistenz führt. Da die vorliegende Anmeldung der allgemeinen Lehrmeinung widerspricht, scheint ein Ausführungsbeispiel nicht ausreichend, um diese Lehrmeinung zu widerlegen.